GENETIQUE QUANTITATIVE ET SELECTION : EVOLUTION DES METHODES ET DES CARACTERES

Beaumont Catherine[1], Chapuis Hervé[2]

[1]INRA-Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly
[2]Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français, 37380 Nouzilly

Résumé

La génétique a largement contribué au développement considérable de la filière avicole, notamment grâce aux caractéristiques biologiques des espèces avicoles, particulièrement favorables à la sélection. Les demandes actuelles des consommateurs et des professionnels de la filière avicole amènent le généticien à considérer de nouveaux caractères : qualité des produits, résistance aux maladies (infectieuses ou non), réduction des rejets d'effluents, bien-être des animaux… En parallèle les méthodes d'analyse progressent vers une meilleure modélisation des caractères et des effets génétiques mais aussi vers une intégration des résultats de génétique moléculaire. L'ensemble permet non seulement d'introduire en sélection de nouveaux critères mais aussi de renouveler l'étude des caractères déjà sélectionnés, tels que la croissance ou la ponte.

Introduction

L'évolution des performances des espèces avicoles a été considérable : les résultats enregistrés à la Station de Ploufragan montrent que le poids vif à 42 jours des poulets de type chair a augmenté, entre 1962 et 1985, de 45 grammes par an en moyenne (L'Hospitalier et al.,1986) tandis que le nombre d'œufs pondus en 47.5 semaines est passé de 194 en 1960 à 284 en 1994 (Besbès et Protais, 1995). Il est classiquement admis que la sélection expliquerait au moins la moitié de ces gains, ce que confirment largement les calculs de Jego et al. (1995) sur les poulets de type chair et ceux de Besbès et Protais (1995) sur les pondeuses.

L'efficacité de la sélection avicole doit beaucoup aux caractéristiques biologiques des espèces avicoles. Ainsi, l'espérance du progrès génétique dépend-elle de quatre paramètres, tous favorables en aviculture :

- l'intensité de sélection (qui dépend de la pression de sélection, pourcentage d'animaux retenus par rapport aux nombre d'individus mesurés),
- la précision de l'évaluation génétique (c'est-à-dire la précision de l'estimation de la valeur des individus candidats à la sélection),
- la variabilité du caractère sélectionné (qui détermine le gain à attendre d'une sélection),
- l'intervalle de génération.

En effet, la forte prolificité des espèces avicoles permet à la fois d'appliquer une pression de sélection satisfaisante et d'obtenir des tailles de familles suffisantes à une bonne estimation des valeurs génétiques des candidats à la sélection. Cette évaluation génétique est d'autant plus précise que la petite taille des animaux permet de regrouper un grand nombre d'individus dans des conditions similaires, limitant ainsi les confusions entre effets génétiques et effets du milieu. Enfin le faible intervalle de génération permet d'enchaîner rapidement les générations.

La qualité des dispositifs quasi-expérimentaux mis en place en aviculture a ainsi permis de mener, dès les années 30, une sélection efficace. Mais la sélection avicole a également largement bénéficié des progrès réalisés par la génétique quantitative, branche de la génétique qui s'intéresse à la transmission des caractères d'intérêt économique. En particulier, l'utilisation des méthodes modernes d'évaluation génétique et d'estimation des paramètres génétiques a permis de gagner en efficacité ; cette évolution se poursuit. En parallèle, le développement considérable de la génétique moléculaire annonce une intégration prochaine de certains résultats dans les schémas de sélection. Mais celle-ci suscite de nouvelles questions qui ne pourront être résolues que par une approche associant ces deux branches de la génétique. Enfin, la demande des consommateurs et de la filière amène à considérer de nouveaux critères de sélection.

1. Evolution des méthodes

1.1 Evolution des modèles d'analyse des caractères

Le modèle de base de la génétique quantitative est le modèle polygénique infinitésimal. Celui-ci explique la variabilité génétique d'un caractère donné par l'action conjointe d'une infinité de gènes additifs ou "polygènes" dont chacun a un effet infiniment petit sur le caractère. La valeur génétique des animaux, somme de l'effet de ces polygènes, a donc une

distribution normale. Il en est de même du caractère ainsi modélisé ou phénotype. La quasi-normalité des distributions des principaux caractères sélectionnés (poids vif en particulier) a encouragé les théoriciens à développer des méthodologies statistiques qui exploitent ce modèle. Celles-ci ont montré leur efficacité et continuent à progresser, notamment grâce à l'augmentation de la puissance des ordinateurs. Ainsi, les méthodes de Gibbs sampling permettent d'affiner encore davantage les calculs et fournissent au généticien la distribution des paramètres génétiques estimés, permettant ainsi des comparaisons plus rigoureuses (Wang et al., 1993). Toutefois, malgré sa remarquable puissance opérationnelle, ce modèle purement additif n'est pas totalement satisfaisant, notamment lorsque la distribution des caractères étudiés s'éloigne de la normalité. Il importe aussi d'améliorer la modélisation des effets génétiques.

1.1.1.Prise en compte de distributions non normales

Sous la pression des consommateurs, les préoccupations des différentes filière animales se sont orientées vers des critères plus qualitatifs (résistance aux maladies, coloration, performances de couvoir…) lesquels présentent, pour la plupart, une distribution discrète. Dans certains cas, l'existence de gènes majeurs a été démontrée (nanisme, couleur ou structure du plumage) ce qui permet de proposer des stratégies complémentaires à la sélection quantitative. Mais, le plus souvent, il faut avoir recours à la sélection sur des performances dont la distribution présente plusieurs catégories phénotypiques, correspondant par exemple à une échelle de couleur des pattes, ou peut se réduire à deux classes (présence/absence de germes, mortalité/survie…). Pour ce type de caractères, les modèles d'analyse classiques sont particulièrement inopérants : comme l'ont rappelé Chapuis et Beaumont (2002), étudier la variabilité génétique d'un caractère binaire en ignorant la nature particulière de sa distribution conduit à des estimateurs fortement biaisés. L'utilisation en sélection de méthodes adaptées aux caractères discrets est désormais effective, notamment pour la sensibilité aux boiteries (Le Bihan Duval et al., 1996, Chapuis et al., 2001). Mais des perfectionnements peuvent être apportés. Les modèles utilisés pour l'instant supposent en effet l'homogénéité des variances, ce qui conduit à accorder une pondération excessive aux performances obtenues dans les classes les plus variables. Ceci est d'autant plus préjudiciable que la grille de notation est arbitraire, ce qui est souvent le cas des notes de qualité, influencées par le niveau moyen du lot considéré. Différents modèles ont été proposés, qui prennent en compte des facteurs d'hétérogénéité de variance dans les modèles à seuils (Foulley et Gianola, 1996 ; Jaffrezic et al., 1999). A notre connaissance, aucune application en aviculture n'a encore été publiée à ce jour.

D'autres données actuellement à l'étude présentent une distribution éloignée de la normalité. Tel est en particulier le cas des données de survie qui présentent la particularité d'être censurées : soit les animaux meurent pendant la phase d'élevage, soit ils sont encore en vie à la fin du cycle. Dans ce dernier cas il y a censure puisque l'on ne sait pas quelle aurait été leur durée de vie réelle si l'observation avait été poursuivie. Une méthode d'analyse de telles données (Ducrocq, 1994) est désormais disponible, de même que le logiciel correspondant (Ducrocq et Sölkner, 1998), ce qui permet d'étudier la longévité, en particulier dans des conditions d'élevage éprouvantes, telles que des cages collectives où s'exprime le picage (Craig et Muir, 1996a et b), ce qui pourrait être un moyen d'obtenir des souches mieux adaptées aux conditions de l'élevage dit alternatif (Ducrocq et al., 2000).

L'étude de données répétées au cours de la vie de l'animal (comme le poids ou la ponte) constitue un autre domaine de recherches très actives. Le but est de mieux utiliser l'information disponible en intégrant aux calculs de sélection l'ensemble des mesures élémentaires : pesée à différents âges pour le poids, nombre d'œufs par semaines pour la ponte… (Foulley et Robert-Granié, 2002). Parmi les approches statistiques possibles figure la modélisation des courbes de croissance (voir la revue de Mignon-Grasteau et Beaumont, 2000) ou de ponte (voir par exemple Anang et al., 2002) qui permet de prendre en compte la cinétique d'évolution des performances. L'étude des séries de ponte (pendant lesquelles la poule pond chaque jour un œuf) apparaît également comme une approche intéressante : déjà sélectionnée avec succès chez la poule (Tixier-Boichard et al., 1995, 2003), elle présente une héritabilité supérieure au taux de ponte (Chen et Tixier-Boichard, 2003). Elle pourrait s'appliquer à d'autres espèces, comme l'Oie chez laquelle son étude a débuté (Brun et al., 2002).

L'ensemble de ces approches pose de nouvelles questions, notamment celles de combiner les valeurs génétiques estimées avec des modèles linéaires (caractères de production classiques) ou non (caractères discrets, données de survie…) pour obtenir un index. Besbes et al. (2002) ont proposé une méthode dont les premiers résultats, encourageants, doivent encore être validés.

1.1.2. Vers une modélisation plus fine des mécanismes génétiques

L'intégration, dans le modèle statistique utilisé pour l'évaluation génétique, d'autres effets aléatoires que la seule valeur génétique additive des candidats à la sélection vise le plus souvent à prendre en compte des effets maternels (ayant ou non une composante génétique) ou encore à mieux prévoir l'intérêt des croisements.

Ce thème apparaît en effet très important dans des espèces principalement exploitées en croisement. Plusieurs études ont porté sur l'estimation des paramètres de croisement qui permettent de prévoir l'intérêt de croisements entre souches (par exemple pour le poids par Barbato et al., 1992) mais beaucoup reste à faire en particulier pour les caractères plus récemment étudiés. La sélection en vue du croisement est une approche complémentaire qui comporte un volet expérimental (Minvielle et al., 1999) et de la modélisation. Nombreuses sont, en effet, les raisons qui poussent le généticien à estimer la part de variabilité due à la dominance : une estimation sans biais de l'héritabilité, une meilleure prédiction des valeurs génétiques additives, voire l'exploitation d'une partie de la variance génétique non additive à travers le croisement, qui est couramment utilisé en aviculture. Mais la combinaison des effets génétiques additifs et non-additifs dans une même évaluation génétique entraîne d'importantes difficultés numériques ayant trait à la construction et à la résolution des équations, ce qui explique le peu d'applications recensées à ce jour, en particulier dans les espèces avicoles.

Dans le cas d'une espèce à diffusion mondiale comme le poulet, se pose inévitablement la question du choix du milieu de sélection et des éventuelles interactions entre l'environnement dans lequel est entretenu le noyau de sélection et le classement des animaux qui le constituent. Ainsi, les poulets de chair issus d'un noyau sélectionné sous nos latitudes tempérées auront-ils des performances optimales dans des conditions de chaleur plus intense en région tropicale? Des études récentes indiquent l'intérêt à la fois de gènes majeurs comme le gène « cou-nu » (Chen et al., 2002) et du test de nouveaux critères de sélection (Taouis et al., 2002). La sélection *in situ* (à supposer qu'elle soit économiquement viable) aurait-elle conduit à des choix différents ? Plus proche de nous, la sélection, en claustration dans des milieux surprotégés que constituent les centres de sélection, fournit-elle les poulets les mieux adaptés aux conditions d'élevage? L'estimation des corrélations génétiques entre performances réalisées dans les deux milieux, ce qui suppose l'identification et le suivi généalogique d'un effectif suffisant, apporte des éléments de réponse en vue d'une sélection plus efficace. Cette approche peut également s'appliquer à l'étude des possibilités de modification du dimorphisme sexuel, (écart de poids entre mâle et femelles, Mignon-Grasteau et al., 1998).

Enfin, cet énoncé des voies de recherche en génétique animale ne saurait être exhaustif sans évoquer le considérable apport potentiel de la biologie moléculaire. En effet, si les interrogations demeurent nombreuses sur le nombre de gènes régissant les différents caractères et leur effet, l'existence de gènes à effet notable, voire très important, sur certains caractères quantitatifs n'est plus à démontrer.

1.2 Vers une intégration des résultats de génétique moléculaire

La recherche des gènes contrôlant les principales performances a débuté chez les volailles comme dans les autres espèces de rente, comme l'a montré la présentation de synthèse faite par Douaire et al. (2001) aux dernières Journées de la Recherche Avicole. Ce type de démarche aura des répercussions sur les modes de sélection avicole. Plusieurs zones du génome (dites QTL pour Quantitative Trait Loci) viennent d'être identifiées, dans une démarche de génomique positionnelle, pour leur effet sur différents caractères : dans cette session seront ainsi présentés les résultats portant sur la composition corporelle (Lagarigue et al., 2002) et la résistance aux coccidies (Pinard-Van der Laan et al., 2003a). D'autres études sont en cours, notamment en France sur l'efficacité alimentaire de la poule pondeuse (Tixier-Boichard et al., 2002 ; Pitel et al., 2001), la croissance en relation avec la qualité de viande et de carcasse (Projet IFAFS coordonné par L. Cogburn) ou la résistance au portage de salmonelles (Beaumont et al., 2003a). Les QTL ainsi identifiés peuvent être intégrés dans les schémas de sélection, soit intra-lignée par sélection assistée par marqueurs (SAM), soit dans des croisements suivis d'introgression (Tixer-Boichard et al., 1997). Dans les espèces avicoles, les applications de la SAM seront sans doute limitées : il faut en effet, avant toute application, identifier à quel allèle du marqueur est associé l'allèle favorable que l'on souhaite sélectionner. Cette étape préalable doit le plus souvent se faire à l'intérieur de chaque famille, ce qui entraîne des coûts élevés. Ceux-ci ne pourront se justifier que pour des caractères particulièrement difficiles à mesurer (comme la résistance aux maladies), ne s'exprimant que dans un sexe ou très tardivement. L'application sera beaucoup plus aisée dès lors que la mutation causale expliquant le QTL aura été identifiée. Ce travail d'identification de la mutation causale est généralement très long ; les premiers succès ont été obtenus dans le cas de gènes à effets majeurs, chez le poulet comme dans d'autres espèces, par exemple sur le gène RN du porc (Milan et al., 2000). Quel que soit l'avancement des connaissances sur le génome, des avancées notables ont d'ores et déjà été réalisées dans la modélisation et le traitement des cas d'hérédité mixte, mettant en jeu un gène

majeur et des polygènes (voir, par exemple, Manfredi, 2000).

Utiliser des marqueurs répartis sur l'ensemble du génome facilite et accélère également l'introduction après croisement d'un nouvel allèle dans une population dite receveuse (Hillel et al., 1993) en permettant de repérer les individus porteurs de l'allèle favorable et ayant éliminé les autres zones du génome donneur. Enfin, l'intérêt d'un croisement entre deux souches peut être prédit par la similarité entre les empreintes génétiques des animaux de ces deux origines (Haberfeld et al., 1996) au moins dans le cas de sélection classique (Minvielle et al., 2000).

A plus long terme la génomique aura d'autres conséquences sur la sélection : en améliorant la connaissance des mécanismes en jeu, notamment à travers l'étude du niveau d'expression des gènes (génomique expressionnelle), elle permettra d'approfondir l'étude de la variabilité génétique et débouchera sur des critères de sélection (parmi lesquels le niveau d'expression de certains gènes). A terme, de nouveaux gènes seront identifiés, ce qui facilitera leur utilisation en sélection et permettra de mieux comprendre les interactions entre gènes.

2. Evolution des caractères sélectionnés

2.1. Qualité des produits

La qualité des produits est une préoccupation très générale de la filière. Certaines caractéristiques, comme la qualité interne de l'œuf, appréciée par les unités Haugh, ou la résistance de la coquille sont déjà prises en compte dans les schémas de sélection mais pourraient bénéficier des nouvelles avancées faites sur la caractérisation moléculaire de la coquille (Nys et al., 2001). Des études sont également en cours sur l'aptitude au gavage du mulard (Larzul, 2002).

Mais la plupart des études portent sur la qualité des viandes et carcasses. En effet, le marché français du poulet est en pleine mutation : si les ventes sous forme de carcasse entière sont en perte de vitesse, les produits élaborés connaissent une forte croissance, que ce soit pour les produits de type industriel ou pour ceux vendus sous signe de qualité tels que les labels. En conséquence, après la réduction de l'engraissement, la qualité des carcasses et en particulier le développement des muscles pectoraux, morceaux nobles de la carcasse, représentent aujourd'hui des objectifs prioritaires de la filière. Ces caractères présentent des héritabilités élevées, ce qui montre les fortes possibilités d'amélioration génétique de ces caractères chez la dinde (Chapuis et al., 1996), le poulet (Le Bihan-Duval et al., 1998) et l'oie (Larzul et al., 2000). Ces caractères, déjà sélectionnés dans la très grande majorité voire la totalité des souches de type intensif, seront sans doute de plus en plus souvent considérés dans les productions de type plus extensif et éventuellement sélectionnés indirectement par une modification génétique des courbes de croissance (Leclercq et al., 1989).

Mais la principale innovation dans ce domaine viendra sans doute de l'importance accordée à la qualité de la viande. La lourdeur de la mesure de la qualité organoleptique de la viande rend, pour l'instant du moins, toute amélioration génétique directe de ce type de caractère impossible. En revanche, les études sur la qualité technologique de la viande se développent et ce d'autant plus que des viandes de mauvaise qualité, présentant des pertes en eau excessives ou une instabilité de la couleur sont de plus en plus souvent décrites. Ces défauts pourraient notamment résulter de viandes de type "Pale, Soft, Exsudative" (PSE). Le déterminisme de ce phénotype PSE ainsi que de celui des viandes acides ont fait l'objet de nombreux travaux chez le Porc (Monin et Sellier, 1985). Ceux-ci ont montré l'importance dans la qualité technologique de la viande de la cinétique de pH. Les travaux sur les espèces avicoles sont par contre très récents.

Chez le poulet, les premières études (Le Bihan-Duval et al., 1999 et 2001) portaient sur la vitesse de chute de pH, le niveau de pH ultime, la coloration et les pertes en eau de la viande fraîche. Tous ces caractères présentent des héritabilités élevées (variant de 0.35 à 0.49 pour le pH et de 0.50 à 0.57 pour les paramètres de coloration de la viande), ce qui montre l'utilité de la prise en compte de ces caractères en sélection. L'étude d'un croisement diallèle entre canard Pékin et canard de Barbarie montre également le rôle de la génétique, en particulier sur la couleur et les propriétés mécaniques de la viande (Larzul et al., 2002). Il faut maintenant préciser l'importance des interactions entre aptitudes génétiques pour la qualité de la viande et conditions d'abattage et étudier le rôle, dans les espèces avicoles, des gènes analogues à ceux impliqués chez le Porc dans la régulation de la qualité de la viande : récepteur à la ryanodine, responsable du syndrome d'hypersensibilité au stress et gène RN, récemment cloné par Milan et al. (2000).

2.2. Résistance aux maladies

Les contraintes expérimentales ainsi que les modalités d'application diffèrent grandement selon que l'on considère des maladies d'origine infectieuse ou non. La sélection apparaît comme l'une des seules méthodes de lutte efficaces contre les troubles dits plurifactoriels (comme les boiteries), dont l'étiologie reste très mal connue mais pour lesquels plusieurs facteurs favorisants ont été identifiés. Mais leur fréquence étant peu prévisible, leur étude génétique nécessite l'observation d'un grand nombre d'animaux. De plus leur diagnostic est parfois, en l'absence de lésion spécifique, délicat. A l'opposé, il est possible de reproduire expérimentalement les maladies

infectieuses et donc de maîtriser les conditions de mesure mais cela implique de disposer d'animaleries protégées et élève considérablement les coûts. Comme les animaux infectés ne peuvent plus être utilisés comme reproducteurs (parce que morts ou porteurs du germe) la sélection ne pourra se faire que sur collatéraux, en mesurant les frères des candidats à la sélection. Dans ce cas disposer de marqueurs génétiques de la résistance améliorerait fortement la rentabilité de la sélection.

2.2.1. Résistance génétique aux troubles plurifactoriels

La notion de troubles plurifactoriels regroupe un grand nombre de syndromes, tous susceptibles d'une amélioration génétique. Nous limiterons notre propos à deux types de caractères : discrets (les boiteries) ou censurés (la longévité), l'approche retenue pouvant servir à d'autres troubles plurifactoriels (comme les ascites, Sanchez et al., 2000).

Réduction des boiteries : Les troubles locomoteurs affectent la quasi-totalité des espèces avicoles. Ils sont responsables de graves souffrances pour l'animal et occasionnent de lourdes pertes, tant directes (par réforme des animaux) qu'indirectes en perturbant la croissance. A la suite de la distinction par Leterrier et Nys (1992) des déformations de type varus et valgus des membres inférieurs du poulet de chair, les travaux de Le Bihan-Duval et al. (1996) ont permis d'estimer les héritabilités de ces deux troubles à 0.23, ce qui permet d'espérer une sélection efficace contre les boiteries. La faible corrélation génétique estimée entre varus et valgus suggère que ces deux types de déformations aient deux origines différentes, ce qui a remis en cause le mode de sélection qui utilisait comme critère la note globale (présence ou absence de pattes tordues). La sensibilité aux boiteries des autres espèces avicoles peut également être réduite par sélection : son héritabilité est de 0.30 chez le canard de Barbarie et de 0.28 chez la pintade (Chapuis et al., 2001). Si ces valeurs permettent d'espérer des résultats à moyen terme, le succès de la sélection est également conditionné par la valeur des corrélations entre la résistance aux boiteries et les autres caractères sélectionnés. Estimer cette corrélation et l'utiliser dans les calculs de sélection facilite l'amélioration conjuguée des performances et de la résistance (Le Bihan-Duval et al., 1997 chez le poulet, Chapuis et al., 2001 chez le canard de Barbarie). Cette approche pourra d'ailleurs se généraliser à d'autres caractères.

Réduction de la mortalité en élevage : Réduire la mortalité en élevage a une évidente justification économique. C'est également un objectif éthique. En analysant la survie d'un animal comme une variable binaire (mortalité/survie à l'issue de la période d'élevage), Chapuis et al. (2001) obtiennent une héritabilité assez faible (0.10 chez le canard de Barbarie), mais qui permet d'identifier des familles présentant des gènes de viabilité favorables. Par ailleurs, différents travaux ont déjà été consacrés à l'analyse et l'amélioration de la longévité de poules élevées en cages collectives (Ducrocq *et al.*, 2000 et §1.1.).

2.2.2. Résistance génétique aux maladies infectieuses

Augmenter la résistance des animaux aux maladies infectieuses a été envisagé dès les années 30 pour réduire les conséquences des épizooties qui ravageaient alors les troupeaux qu'elles soient dues à des bactéries, des virus (Beaumont et al., 2003b) ou des parasites (Pinard-Van der Laan et al., 2003b). Avec les progrès sanitaires, ce type d'infection est devenu rare et le coût d'une sélection sur la résistance ne se justifie désormais qu'en l'absence de vaccin ou de traitement efficace et accepté par les consommateurs.

Tel est en particulier le cas des coccidioses dont la chimio-prévention risque d'être restreinte voire interdite en Europe, alors que le coût des vaccins reste très élevé. Des études sont en cours (Pinard-Van der Laan et al. 2003a) qui devraient permettre d'identifier des marqueurs de la résistance.

De même la résistance au portage de salmonelles pourrait être utilisée comme moyen de lutte contre les risques de contamination humaine. En effet, si l'on sait vaincre les symptômes de cette maladie, il est par contre impossible d'éliminer cette bactérie d'un troupeau commercial, en raison de l'existence d'animaux dits "porteurs sains". Ceux-ci peuvent héberger des salmonelles pendant plusieurs semaines sans exprimer le moindre symptôme. Ils représentent une des principales difficultés de la lutte contre les salmonelles car ils ne se distinguent de leurs congénères indemnes qu'au prix d'analyses approfondies. En conséquence, sélectionner des animaux sur la résistance au portage pourrait réduire la fréquence des porteurs et donc les risques de toxi-infection alimentaire. Des estimations récentes de l'héritabilité de la résistance au portage, défini comme la persistance de la bactérie plusieurs semaines après inoculation, ont montré qu'il s'agissait d'un caractère qui pourrait bénéficier d'une amélioration génétique que ce soit chez l'adulte (Beaumont et al., 1999) ou le poussin (Berthelot, 1998). Toutefois, cette sélection apparaît, comme toute expérience de ce type, délicate à appliquer à grande échelle, d'où l'intérêt de l'étude des gènes en cause (Beaumont et al., 2003a).

Une autre approche, plus générale, vise à sélectionner des lignées divergentes sur leur réponse immunitaire pour constituer des modèles animaux particulièrement appropriés à la recherche des gènes en cause et à la compréhension des relations entre capacité immunitaire, résistance aux maladies et niveau de production en relation avec le milieu (Pinard-Van der

Laan et al, 1998). Ainsi, l'expérience de sélection menée par Pinard-Van der Laan (2002) sur la réponse en anticorps, la réponse cellulaire et les capacités de phagocytose montre-t-elle à la fois la faisabilité d'une amélioration génétique de ces trois critères et leur indépendance.

Enfin, des études récentes visent à tester les possibilités d'amélioration génétique d'autres mécanismes généraux de résistance, comme les capacités bactériostatiques de l'œuf (Vidal et al., 2003), qui pourraient également améliorer la sécurité sanitaire.

2.3. Réduction des rejets dans l'environnement

Les rejets des animaux d'élevage sont de plus en plus souvent critiqués. Or il est possible de les réduire par sélection. Les travaux précurseurs de Bordas et Mérat (1975) ont montré qu'il était possible de sélectionner des lignées de poules pondeuses divergeant pour leur consommation résiduelle, fraction de l'ingéré qui n'est expliquée ni par les besoins d'entretien de l'organisme, ni par ceux de production (ponte dans ce cas), ce qui rend ce critère de sélection indépendant du niveau de performance de l'animal (Bordas et al., 1992).

Chez le poulet de type « chair », c'est l'indice de consommation qui est considéré. Si sa sélection est déjà pratiquée dans certaines souches destinées aux élevages intensifs (Jego et al , 1995), son coût reste élevé, d'où l'intérêt d'une amélioration indirecte à travers l'accélération de la croissance, la réduction du niveau d'engraissement, la modification de la forme de la courbe de croissance, mais aussi l'augmentation des capacités de digestion des animaux dont Mignon-Grasteau et al. (2003) viennent de montrer qu'il s'agissait d'un caractère très héritable, au moins dans le cas de poulets nourris avec une forte proportion de blé de mauvaise qualité.

2.4. Amélioration des capacités de reproduction

Les capacités de reproduction des animaux sont nécessairement maintenues par la sélection naturelle. Mais la dégradation régulière des performances de reproduction des souches lourdes pourraient à terme renforcer l'importance accordée à ces critères ou susciter de nouvelles recherches, notamment sur les capacités de production spermatiques, domaine qui reste encore extrêmement limité. L'amélioration de la durée de période fertile, pendant laquelle la femelle peut pondre des œufs fertiles après une insémination peut également permettre d'espacer les inséminations (Beaumont, 1992). Cette démarche apparaît particulièrement intéressante dans les espèces comme le canard où la faible durée de période fertile, notamment pour la production de mulards, implique des inséminations rapprochées (Taï et al., 1994).

2.5. Amélioration du bien-être animal

Que ce soit à la demande des consommateurs ou pour tenir compte de la législation européenne, la question du bien-être animal est de plus en plus souvent discutée, ce qui entraîne également des questions sur ses relations avec la génétique (voir revues de Mignon-Grasteau et Faure, 2002 et Faure et al., 2003). Deux grands types d'approches peuvent être considérés dans ce domaine. Le premier porte sur des aptitudes générales (tendance à la peur, motivation sociale, dominance…) qui peuvent modifier un grand nombre de comportements, le seconde se focalise sur un type de comportement particulièrement important.

Améliorer la sociabilité et la sensibilité aux stress pourrait permettre d'augmenter les capacités d'adaptation des animaux lesquelles conditionnent la sensibilité au stress. En conséquence, plusieurs expériences de sélection ont déjà été menées sur des traits généraux de tempérament : la motivation sociale (Mills et Faure, 1991) et la sensibilité au stress mesurée par le taux de corticostérone après un stress social (Gross et Siegel, 1985) ou thermique (Brown et Nestor, 1973), l'activité en open-field (Faure et Folmer, 1975) ou encore la durée d'immobilité tonique chez la Caille (Mills et Faure, 1991). Il faut maintenant tirer tous les enseignements, notamment moléculaires de ces expériences et les transposer à d'autres espèces avicoles. En parallèle, d'autres aptitudes sont à étudier comme la peur vis-à-vis de l'homme, chez le canard (Faure et al., 2002) ou d'autres espèces, ou encore l'activité locomotrice (Bizeray et al., 2000).

Par ailleurs, différents travaux ont été menés pour apporter une réponse spécifique à différentes sources de réduction du bien-être. Tel est en particulier le cas des recherches menées sur la résistance aux maladies (§2.2.) mais aussi de celle visant à limiter le comportement de picage des animaux. Celui-ci étant en partie sous contrôle génétique (voir revue de Chapuis et al., 2000), la sélection de lignées de poulet moins sensibles au comportement de picage pourrait constituer une solution en réduisant les pertes économiques liées au phénomène, sans recourir au débécquage ou à l'élevage en obscurité, tous deux fortement contestés. Au moins trois stratégies de sélection sont recensées à ce jour : l'observation directe des animaux (Kjaer et al., 1997, 2001), la sélection en cages collectives d'apparentées pour les pondeuses (Craig et Muir, 1996a et b), ou le recours à un « picomètre » qui enregistre le nombre et la force de coups de becs portés à un leurre (Bessei, 1999 ; Chapuis et al., 2003). La diversité des pistes suivies par les chercheurs pour limiter le picage illustre à la fois la difficulté de la démarche et l'intérêt qu'elle suscite.

Si la génétique intervient dans ces caractères, son rôle n'est que très partiel puisque ce type de caractère est

influencé par un nombre particulièrement important de facteurs (Beaumont et al., 2002). De nombreuses questions qui sont à résoudre avant d'introduire en sélection un nouveau critère :
-celui-ci doit s'exprimer de façon aussi cohérente que possible dans deux environnements très différents, de sélection et de production,
-il doit être à la fois de portée générale et susceptible d'être mesuré sur de grands effectifs,
-enfin, l'estimation des corrélations génétiques entre tout nouveau critère et les performances zootechniques reste un préalable à toute introduction dans les schémas de sélection commerciale. Si ces questions se posent pour tout critère de sélection, elles sont particulièrement délicates lorsque ce sont des comportements qui sont étudiés.

Conclusion

L'ensemble de cette revue montre l'ampleur et la diversité des possibilités offertes par la génétique avicole. Les applications pratiques de ces différentes approches dépendront de la demande de la filière mais aussi des conséquences indirectes à en attendre. Il est en effet impossible d'obtenir un animal idéal ; il faut se « contenter » de l'animal optimal. De même, il est sans aucun doute impossible d'obtenir des lignées spécialisées pour chaque type de production ou d'élevage et là encore il faut trouver un compromis entre le coût de la sélection et les contraintes de la production. Mais il faut aussi souligner que les progrès génétiques vont de pair avec l'évolution des méthodes d'élevage. Cette « co-évolution » est sans nul doute une des forces de l'aviculture qu'il convient de préserver.

Références bibliographiques

Anang A., Mielenz N., Schüler L., 2002. Brit. Poult. Sci., 43:384-390

Barbato G. F., 1992. Poult. Sci. 71:789-798.

Beaumont C., 1992. Can. J. Anim. Sci., 72, 193-201.

Beaumont C., Protais J., Guillot J.F., Colin P., Proux K., Millet N., Pardon P., 1999. Avian Path., 28, 131-135

Beaumont C., Roussot O., Marissal-Avry N., Mormède P., 2002. INRA Prod. Anim., sous presse.

Beaumont C., Protais J., Pitel F., Lantier F., Plisson-Petit F., Colin P., Protais M., Le Roy P., Leveque G., Malo D., Elsen J.M., Milan D., Lantier I., Neau A., Salvat G., Vignal A., 2003a. Poult. Sci., Accepté sous réserve de modifications.

Beaumont C., Dambrine G., Chausse A.M., Flock D., 2003b. In: Poultry Gen., Breed. and Biotech., Muir (éd), Sous presse.

Berthelot F., Beaumont C., Mompart F., Girard-Santosuosso O., Pardon P., Duchet-Suchaux M., 1998. Poult. Sci., 77, 797-801.

Besbès B, Protais M., 1995. p. 128-130 In : 1ères. Jour. de la Rech. Avic., Angers 28-30 Mars, ITAVI, Paris.

Besbès B., Protais M., 1995. p. 128-130 In : 2èmes Jour. de la Rech. Avic., Tours 8-10 Avril.

Besbès B., Ducrocq V., Protais M., 2002. 7th World Cong. on Livest. Product. Montpellier, 19-23 Août, INRA-CIRAD, Paris.

Bessei W., 1999. Lohmann Information, 22, 27-31.

Bizeray D., Leterrier C., Constantin P., Picard M., Faure J.M., 2000. Appl. Anim. Behav., 68, 231-242.

Bordas A., Mérat P., 1975. Ann. Gén. Sél. Anim.,7, 331-334.

Bordas A., Tixier-Boichard M., Mérat P., 1992. Brit. Poult. Sci., 33, 741-754.

Brown K. I., Nestor K. E., 1973. Poult. Sci., 52, 1948-1954.

Brun J.M., Delaunay I., Sellier N., Alletru N., Rouvier R., Tixier-Boichard M ., 2002. p.5-8 In : 5èmes Jour. de la Rech. sur les Palmip. à Foie Gras, Pau, 9-10 Octobre, ITAVI, Paris.

Chapuis H., 1997. Thèse de doctorat de l'ENSAR.

Chapuis H., Tixier-Boichard M., Delabrosse Y., Ducrocq V., 1996. Gen. Sel. Evol., 28, 299-317.

Chapuis H., Beaumont C., Faure J.M., 2000. Sci. et Tech. Avic., 31, 5-15.

Chapuis H., Le Bihan-Duval E., Maillary L., Beaumont C., 2001. Sci. et Techn. Avic., 37, 11-17.

Chapuis H., Beaumont C., 2002. 7th World Cong. on Livest. Prod., Montpellier, 19-23 Août, INRA-CIRAD, Paris.

Chapuis H., Boulay M., Retailleau J.P., Arnould C., Mignon-Grasteau S., Berri C., Coudurier B., Faure J.M., 2003. 5èmes Jour. de la Rech. Avic., Tours, 27-29 Mars, ITAVI, Paris.

Chen C.F., Bordas A., Tixier-Boichard M., 2002. 7th World Cong. on Livest. Product.. Montpellier, 19-23 Août, INRA-CIRAD, Paris.

Chen C.F., Tixier-Boichard M., 2003. Poult. Sci., sous presse.

Craig J.V., Muir W.M., 1996a. Poult. Sci., 75, 1145-1155.

Craig J.V., Muir W.M., 1996b. Poult. Sci., 75, 294-302.

Douaire M., Vignal A., Duclos M., Dambrine G., 2001. p. 357-364. In : 4èmes Jour. de la Rech. Avic., Nantes, 27-29 Mars, ITAVI, Paris.

Ducrocq V., 1994. J. of Dairy Sci., 77, 855-866.

Ducrocq V., Sölkner J., 1998. Manuel d'utilisation d'un logiciel.

Ducrocq V., Besbes B., Protais M., 2000. Gen. Sel. Evol. , 32, 23-40

Faure J.M., Folmer J.C., 1975. Ann. Gén. Sél. Anim., 7, 123-132.

Faure J.M., Val-Laillet D., Guy G., Bernardet M.D., Guémené D., 2002. p. 64-68. 5èmes Jour. de la Rech. sur les Palmip. à Foie Gras, Pau, 9-10 Octobre, ITAVI, Paris.

Faure J.M., Bessei W., Jones R.B., 2003. In: Poultry Gen., Breed. and Biotech., Muir (éd), Sous presse.
Foulley J. L., Gianola D., 1996. Gen. Sel. Evol. 28, 249-273.
Foulley J.L. and Robert-Granié C., 2002. Document de cours, 159p.
Gross W.B., Siegel P.B., 1985. Poult. Sci., 64, 2230-2233.
Haberfeld A., Dunnington E.A., Siegel P.B., Hillel J., 1996. Poult. Sci., 75, 951-953.
Hillel J., Verrinder Gibbins A.M., Etches R.J., Shaver D. McQ., 1993. Poult. Sci., 72, 1197-1211.
Jaffrezic F., Robert-Granié C., Foulley J.L., 1999. Gen. Sel. Evol., 31, 301-318
Jégo Y., Besbès B., Donal J.L., 1995. p. 125-127 In : 1ères Jour. de la Rech. Avic., Angers 28-30 Mars, ITAVI, Paris.
Kjaer J.B., Sørensen P., 1997. Brit. Poult. Sci., 38, 333-341.
Kjaer J.B., Sorensen P., Su G., 2001. Appl. Anim. Behav. Sci., 71, 229-239.
Larzul C., Rouvier R., Rousselot-Pailley D.,Guy G.**,** 2000. Gen. Sel. Evol., 32, 415-427.
Larzul C., 2002. p. 33-36 In : 5èmes Jour. de la Rech. sur les Palmip. à Foie Gras, Pau, 9-10 Octobre, ITAVI, Paris.
Larzul C., Imbert B., Bernardet M.D., Guy G., Rémignon H., 2002. p. 29-32 In : 5èmes Journées de la Rech. sur les Palmip. à Foie Gras, Pau, 9-10 Octobre, ITAVI, Paris.
Le Bihan-Duval E., Beaumont C., Colleau J.J., 1996. Gen. Sel. Evol., 28, 177-195
Le Bihan-Duval E., Beaumont C., Colleau J.J., 1997. J. of Anim. Breed. and Genet., 114:239-259
Le Bihan-Duval E., Mignon-Grasteau S., Millet N., Beaumont C., 1998. Brit. Poult. Sci., 39, 346-353.
Le Bihan E., Millet N., Rémignon H., 1999. Poult. Sci., 78, 822-826.
Le Bihan E., Berri C., Baeza E., Millet N., Beaumont C., 2001. Poult. Sci., 80, 839-843.
Leclercq B., Guy G., Rudeaux F., 1989. Gen. Sel. Evol., 21, 69-80
Leterrier C., Nys Y., 1992. Av. Path., 21, 429-442
L'Hospitalier R., Bougon M., Le Menec M., Quémeneur P., 1986. Bull. Inf. St. Exp. Avic. Ploufragan, 26, 3-14.
Manfredi E., 2000. INRA-Prod. Anim., Numéro Hors-série « Génétique Moléculaire : principes et applications aux populations animales », 239-242.
Mignon-Grasteau S., Beaumont C., Poivey J.P., de Rochambeau H. 1998. Gen. Sel. Evol., 30, 481-491.
Mignon-Grasteau S., Beaumont C., 2000. INRA Prod. Anim., 13, 337-348.
Mignon-Grasteau S., Faure J.M., 2002. INRA Prod. Anim., sous presse.
Mignon-Grasteau S., Muley N., Bastianelli D., Gomez J., Hallouis J.M., Besnard J., Millet N., Carré B. 2003. 5èmes Journées de la Rech. Avic., Tours, 27-29 Mars, ITAVI, Paris.
Milan D., Jeon J.T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Iannucelli N., Rask L., Ronne H., Lundström K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Le Roy P., Chardon P., Andersson L., 2000. Science, 288, 1248-1251.
Mills A., Faure J.M., 1991. J. Comp. Psych., 105, 25-38.
Minvielle F., Monvoisin J.L., Costa J., Frenot A., Maeda Y., 1999. J. of Anim. Breed. and Gen., 116, 363-377.
Minvielle F., Coville J.L, Krupa A., Monvoisin J.L., Maeda Y., Okamoto, S., 2000. Gen., Sel., Evol. 32, 289-302.
Monin G., Sellier P., 1985. Meat Sci., 13, 49-63.
Nys Y., Gautron J., Mc Kee M.D., Garcia-Ruiz J.M., Hincke M., 2001. World's Poult. Sci. J., 57.
Pinard-Van der Laan M.H., Siegel P.B., Lamont S.J., 1998. Poult. Avian Biol. Rev., 9, 122-141.
Pinard-Van der Laan M.H., 2002. Vet. Immun. and Immunopath., 87, 199-205.
Pinard-Van der Laan M.H., Pitel F., Feve K., Coville J.L., Legros H., Monvoisin J.L. , Neau A., Repérant J.M.; 2003a. In : 5èmes Journ. de la Rech. Avic., Tours,26-27 Mars, ITAVI, Paris.
Pinard-Van der Laan M.H., Lillehoj H.S., James J. Zhu., 2003b. In: Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology, Muir (éd), Sous presse
Pitel F., Feve K., Vignal A., Tixier-Boichard M., Coville J-L., Bordas A., 2001. 397-403 In : 4èmes Jour. de la Rech. Avic., Nantes, 27-29 Mars, ITAVI, Paris
Sanchez A., Plouzeau M., Rault P., Picard M., 2000, INRA Prod. Anim., 13, 37-45.
Taï L.J.J., Rouvier R., Poivey J.P., 1994. Br. Poult. Sci., 35, 377-384.
Taouis M., De Basilio V., Mignon-Grasteau S., Crochet S., Bouchot C., Bigot K., Collin A., Picard M., 2002. Poult. Sci., 81, 118-121.
Tixier-Boichard M., Douaire M., Beaumont C., Elsen J.M., 1997. p. 41-48. In : 2èmes Journ. de la Rech. Avic., Tours, 8-10 Avril, ITAVI, Paris.
Tixier-Boichard M., Bordas A., Renand G., Bidanel J.P., 2002. 7th World Cong. on Livest. Prod., INRA-CIRAD, Montpellier.
Tixier-Boichard M., Chen C.F., Heirman T., Garcia Lara T., Schobert A., Gourichon D., 2003. In : 5èmes Journ. de la Rech. Avic., Tours, 26-27 Mars, ITAVI, Paris
Vidal M.L., Baron F., Ahmed A., Michel J., Gautron J., Beaumont C., Gautier M., Nys Y., 2003. In : 5èmes Journ. de la Rech. Avic., Tours, 26-27 Mars, ITAVI, Paris
Wang C.S., Rutledge J.J., Gianola D., 1993. Gen. Sel. Evol., 25, 41-62.

RECHERCHE DE MARQUEURS GENETIQUES DE LA RESISTANCE A LA COCCIDIOSE CHEZ LA POULE

Pinard-van der Laan Marie-Hélène[1], Coville Jean-Luc[1], Monvoisin Jean-Louis[1] , Neau André[2], Pitel Frédérique[3], Feve Katia[3], Vignal Alain[3], Legros Hélène[4], Thomas Martine[5], Répérant Jean-Michel[5], Rault Paul[6]

[1] UMR Génétique et Diversité Animales, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas
[2] Département de Génétique Animale, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas
[3] Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex
[4] Laboratoire d'Analyses Génétiques – LABOGENA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas
[5] UR VIPAC, Equipe de Parasitologie, AFSSA - Zoopôle les Croix BP 53 22440 Ploufragan
[6] Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles, 37380 Nouzilly

Résumé

L'utilisation de la résistance génétique comme moyen de lutte alternatif contre la coccidiose étant souhaitée, un projet de détection de marqueurs de la résistance à la coccidiose (*Eimeria tenella)* a été initié. Deux lignées ont été identifiées comme résistante (lignée égyptienne Fayoumi) et sensible (lignée Leghorn Blanche) à *E. tenella*. Un croisement de type F2 (n=860) a été produit et testé pour la résistance à *E. tenella*. Les gains de poids, mortalités, lésions ont été mesurés. Afin de limiter le nombre de génotypages, l'analyse dite « des extrêmes » a été appliquée, c'est à dire que seuls les 15 % les plus résistants et les 15 % les plus sensibles intra familles ont été typés pour 139 marqueurs retenus pour leur informativité. Deux régions chromosomiques ont pour l'instant été analysées et ont montré des effets significatifs sur des caractères de résistance. Une fois les marqueurs de résistance identifiés dans ce croisement expérimental F2, une étape de validation est nécessaire dans des populations commerciales pour confirmer l'effet sur la résistance et l'absence d'effet négatif sur d'autres caractères économiques.

Introduction

La coccidiose est une des maladies les plus importantes en volaille et les moyens de lutte utilisés sont essentiellement les anticoccidiens. Or, des phénomènes de résistance à ces produits et une réduction souhaitée de l'utilisation d'additifs limitent à terme leur emploi. L'utilisation de la résistance génétique comme moyen de lutte alternatif serait donc souhaitée, en particulier dans les lignées Label où l'image du produit est déterminante.

Bien avant la recherche de marqueurs génétiques de la résistance à la coccidiose, les preuves d'une variabilité génétique ont été largement démontrées par des expériences de sélection réussies ou l'observation de larges différences entre des lignées de poules (revu par Pinard-van der Laan et al., 2003). Même si un rôle du complexe majeur d'histocompatibilité a été suggéré, aucun gène candidat n'a pour l'instant été trouvé comme ayant un effet majeur sur la résistance à la coccidiose. Aussi, on ne dispose pas actuellement d'un critère unique de résistance et différents critères doivent être considérés : le gain de poids (affecté par la coccidiose), la mortalité, les lésions, la production d'oocystes, l'hématocrite. Tous ces critères apparaissent souvent corrélés et il serait intéressant de pouvoir concevoir un index de résistance. Aussi, les corrélations entre les résistances à plusieurs espèces de coccidies sont encore très peu étudiées. Plus globalement, de nouvelles études sont nécessaires pour comprendre mieux les mécanismes et les interactions entre l'hôte et le pathogène.

Jusqu'à présent, une seule autre étude de recherche de marqueurs de résistance à la coccidiose a été initiée par Zhu et al. (2003). Celle ci a été réalisée en utilisant 119 marqueurs microsatellites sur 314 F2 issus d'un double croisement de deux lignées commerciales de type broiler et présentant de larges différences pour la résistance à une espèce d'*Eimeria*, *E. maxima*. Pour ces auteurs, en l'absence d'un index qui reste à mettre au point, le meilleur critère de résistance était la production d'oocystes. C'est pour ce critère qu'ils ont identifié une région QTL (quantitative trait loci) sur le chromosome 1.

En parallèle de protocoles de détection de QTLs, d'autres voies sont envisagées comme la génomique fonctionnelle pouvant elle aussi être appliquées sur des phénotypes extrêmes. Aucun résultat n'est pour l'instant disponible.

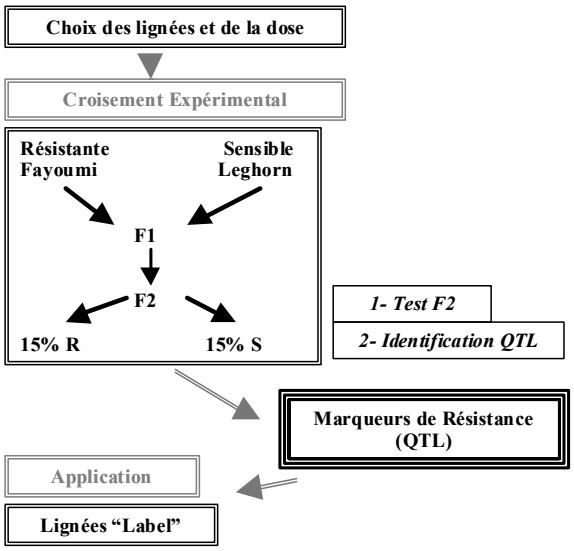
Le but de l'étude présentée ici est d'exposer une stratégie de recherche de marqueurs de la résistance à *E. tenella*. Dans un croisement expérimental de type F2, des marqueurs génétiques associés à différents critères de résistance à la coccidiose ont été recherchés. Les premiers résultats sur deux régions chromosomiques sont présentés. Ce travail bénéficie d'un financement « Aliment, Qualité, Sécurité ».

1. Matériel et méthodes

1.1. Dispositif de croisement et mesure de la F2 pour la résistance à Eimeria tenella

La stratégie choisie pour identifier des marqueurs de résistance à la coccidiose a été de réaliser un croisement de type F2 à partir de lignées présentant des phénotypes extrêmes et dans lequel des marqueurs sont recherchés (Figure 1). Après une comparaison de plusieurs lignées pour leur résistance à *E. tenella* (Pinard-van der Laan et al., 1998) pour déterminer la lignée la plus résistante (Fayoumi) et la plus sensible (Leghorn) et le choix de la dose d'oocystes permettant d'obtenir une différence maximale pour la résistance entre ces deux lignées (Pinard-van der Laan et al., 1996), un croisement F1 a été réalisé à partir de 3 coqs et 7 poules Fayoumi et 3 coqs et 6 poules Leghorn. La F1 s'est montrée aussi résistante que la Fayoumi (Tableau 1). Enfin, 6 pères F1, chacun accouplé à 5 sœurs ou demi-sœurs F1 ont produit 860 F2 (mâles et femelles). Ces 860 F2 ont été testés pour la résistance à *E. tenella* (50.000 oocystes à 4 semaines d'âge) en mesurant la mortalité, les lésions, le gain de poids (Tableau 1), la coloration du plasma, l'hématocrite et la température rectale.

FIGURE 1 : Stratégie de recherche de marqueurs de la résistance à *E. tenella*.



1.2. Choix des marqueurs, des extrêmes et génotypage

Les pères F1 ont été d'abord testés avec plus de 300 marqueurs afin d'identifier les marqueurs informatifs dans le dispositif. Un ensemble de 139 marqueurs a été retenu puis organisé et mis au point en 24 jeux de marqueurs afin de réaliser des génotypages en multiplex sur séquenceur automatique ABI 377 (Perkin-Elmer). Les profils obtenus étaient ensuite analysés et validés en génotypes en utilisant les logiciels Genotyper®.

Afin de réduire le nombre des génotypages à réaliser, la technique du génotypage sélectif a été appliquée (Darvasi et Soller, 1992), c'est-à-dire un génotypage individuel mais des extrêmes (Figure 1). Au sein de chaque famille de mère F1 (et donc à fortiori père F1), les 15% les plus résistants et les 15 % les plus sensibles ont été typés. Chaque mère F1 ayant eu environ 28 descendants F2 testés, les 4 plus résistants et les 4 plus sensibles étaient typés, les sexes étant équilibrés dans tous les cas. Le premier critère de choix était le gain de poids, puis les lésions.

TABLEAU 1 : Moyenne des animaux inoculés par *E. tenella* (50.000) dans les lignées pures (Leghorn et Fayoumi) et leurs croisements F1 et F2

	Leghorn	Fayoumi	F1	F2
Mortalité (%)	27	0	0	1
Lésions	3.5	3.1	3.0	3.1
Gain Poids[1] (%Témoin)	-77	-35	-22	-[3]
Gain Poids[2] ♂	15	38	48	35
Gain Poids[2] ♀	7	29	35	30

[1] Gain de poids corrigé par rapport au lot témoin
[2] Gain de poids brut
[3] Pas de lot témoin en F2

N.B. : les lots témoins non inoculés de Fayoumi et Leghorn ne présentaient pas de différence significative pour le gain de poids. Les variations observées des animaux testés correspondent donc à des variations de résistance.

1.3. Analyse des résultats

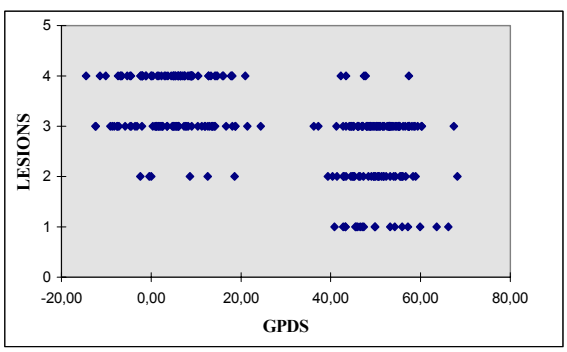
Les données de génotypages, de généalogie et de performances ont été rassemblées et validées dans la base de données Mapgena (Neau et al., 2000). Cette base gère les différentes informations du génotypage (par exemple informativité, transmission des allèles) et sert d'interface pour exporter les données nécessaires à l'outil d'analyse QTL. Celle-ci a été réalisée avec le logiciel QTLmap (Le Roy et al., 1998) qui utilise la méthode du maximum de vraisemblance appliquée à une structure de famille germains - demi-germains. Pour l'analyse QTL, les performances ont été corrigées par analyse de variance pour l'effet lot*sexe et les résidus analysés. Demandant une analyse particulière, la mortalité n'a pas été analysée ici. Seront présentés ici les résultats des analyses de deux régions chromosomiques : les chromosomes 1 et 4, choisis d'abord en raison de l'identification récente de QTLs ou de gènes candidats susceptibles d'affecter la résistance aux maladies

2. Résultats – Discussion

2.1. Caractéristiques des extrêmes et Informativité du dispositif

Bien que choisis à l'intérieur de chaque famille de mère, les deux groupes extrêmes « sensibles » et « résistants » ont constitué deux populations non chevauchantes pour le gain de poids (Figure 2). Moins distinctes pour le caractère lésion, les deux groupes présentent néanmoins des valeurs moyennes différentes : 3.45 et 2.46 pour les sensibles et résistants, respectivement. Les caractéristiques des animaux testés et typés par père (nombre d'animaux et gain de poids) sont données dans le Tableau 2.

FIGURE 2 : Distribution des gains de poids bruts (GPDS) et des lésions des mâles et femelles F2 extrêmes (n=260)



L'hétérozygotie des pères mesurée par le nombre de génotypes hétérozygote pour les 139 marqueurs utilisés était élevée, la moyenne étant de 76.4 %. Les deux lignées d'origine étant différentes et au vu du choix des marqueurs, ce résultat était attendu.

En tenant compte des génotypes des mères F1, le nombre moyen de méioses informatives sur l'ensemble du dispositif était de 171 sur 260 génotypages (66 %). Le détail sur les régions chromosomiques analysées ici est donné dans le Tableau 3.

TABLEAU 3 : Marqueurs utilisés pour analyser des régions des chromosomes 1 et 4 : leur position (pos) sur le chromosome et le % de méioses informatives (% MI) sur l'ensemble du dispositif pour le chromosome 1 et dans la famille 5 pour le chromosome 4.

Chrom. 1			Chrom. 4 – famille 5		
Marqueurs	Pos	% MI	Marqueurs	Pos	% MI
MCW289	150	68	MCW005	101	100
LEI146	169	65	MCW167	118	84
MCW058	241	60	MCW085	120	0 [1]
LEI101	259	53	ADL266	138	76
ADL314	281	49	LEI094	155	85
			LEI076	182	98

[1] *Le père 5 était homozygote pour le marqueur MCW085*

2.2. Identification de régions du génome intervenant dans les caractères de résistance à E. tenella

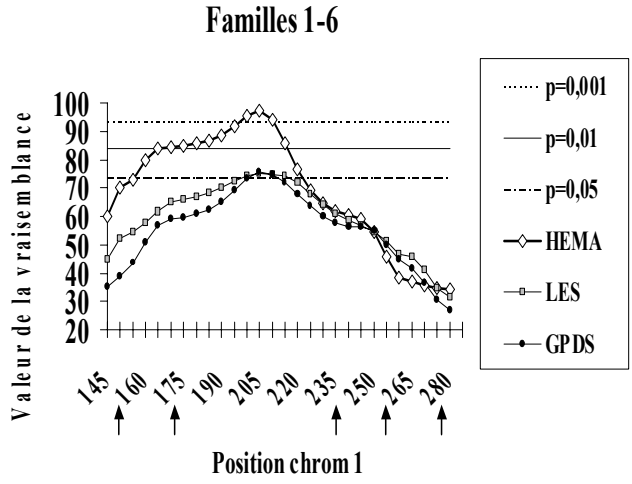
Deux premières analyses ont été réalisées. La première sur une région du chromosome 1 couverte par 5 marqueurs (Tableau 3) et réalisée sur l'ensemble des 6 familles du dispositif. Un effet significatif ($p=0.05$) sur la variabilité du gain de poids et des lésions ainsi qu'un effet très significatif ($p< 0.001$) sur l'hématocrite ont été identifiés (Figure 3).

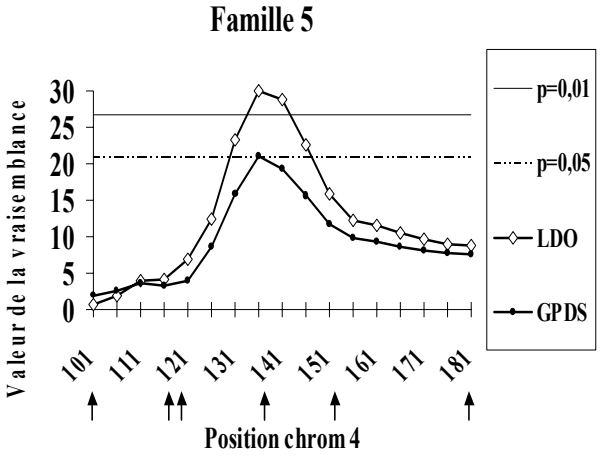
TABLEAU 2 : Hétérozygotie des pères F1, nombre d'animaux F2 mesurés et caractéristiques des extrêmes (R=résistants, S=sensibles) constitués par père pour le gain de poids (résidus après correction pour sexe*lot)

Père F1	Hétérozygotie	n F2 mesurés	n F2 extrêmes typés		Moyenne Gain de Poids (Résidus)	Minimum	Maximum
1	109 / 139	137	R = 22		17.7	7.12	30.0
	(78.4%)		*S = 20*		*-27.9*	*-40.6*	*-11.6*
2	114 / 139	157	R = 20		21.7	14.2	32.0
	(82.0%)		*S = 22*		*-24.5*	*-38.8*	*-10.1*
3	106 / 139	142	R = 22		15.2	3.2	21.8
	(76.3%)		*S = 19*		*-26.7*	*-39.9*	*-13.0*
4	102 / 139	136	R = 21		18.7	8.8	28.4
	(73.4%)		*S = 17*		*-23.3*	*-43.9*	*-3.2*
5	105 / 139	146	R = 22		17.0	4.8	27.8
	(75.5%)		*S = 27*		*-28.2*	*-42.9*	*-19.2*
6	101 / 139	142	R = 24		17.9	4.7	32.7
	(72.7%)		*S = 24*		*-31.0*	*-46.1*	*-18.3*
TOTAL	76.4%	860	260	R = 131	18.0	3.2	32.7
				S = 129	*-27.2*	*-46.1*	*-3.2*

L'analyse donne un maximum de la vraisemblance en position 205 pour ces trois caractères. Cette région montrant une probabilité forte de présence d'un ou plusieurs QTL(s), il serait bon de pouvoir rajouter des marqueurs entre les positions 169 et 241. Dans cette même région (autour de LEI101, position 259), Zhu et al. (2003) ont identifié dans 4 de leurs 12 familles testées pour *E. maxima*, un QTL qui serait lié à l'excrétion d'oocystes. Pratiquement, il serait très intéressant de confirmer la présence d'un QTL lié à la résistance à plusieurs espèces de coccidies.

FIGURES 3 et 4 : Probabilité de présence d'un QTL influençant l'hématocrite (HEMA), les lésions (LES) et le gain de poids (GPDS) sur une région du chromosome 1 et influençant la coloration du plasma (LDO) et le gain de poids (GPDS) sur une région du chromosome 4 dans la famille 5





La deuxième analyse concerne une région du chromosome 4 couverte par 6 marqueurs (Tableau 3). L'analyse faite d'abord sur l'ensemble du dispositif a suggéré quelques régions qui ont ensuite été analysées par famille de père F1. Des résultats significatifs ont été alors obtenus dans la famille 5. Des différences d'informativité aux QTLs d'intérêt peuvent expliquer les variabilités de résultats d'une famille à l'autre. Ici, le % moyen de méioses informatives étaient de 64% sur l'ensemble du dispositif et de 74% dans la famille 5. Un effet significatif (p=0.05) sur la variabilité du gain de poids ainsi qu'un effet très significatif ($p<0.01$) sur la coloration du plasma ont été identifiés (Figure 4), avec un maximum de la vraisemblance en position 136 (proche d'ADL266) pour ces deux caractères. Cette région est riche en gènes de réponses immunitaires et potentiellement liés à la résistance aux coccidies. Un gène codant pour une chémokine K60 et pour l'interleukine 8 (IL8) ont été identifié près d'ADL266 (Hughes et Bumstead, 2000). Se trouvent aussi un gène de régulation de l'interféron 2 (IRF2) (Marienfeld et al., 1997) ainsi qu'une zone bien conservée contenant le toll like receptor (TLR2) et l'interleukine 2 (IL2) (Boyd et al., 2001).

Conclusion

L'analyse de deux régions chromosomiques a permis de suggérer la présence de QTLs sur la résistance à *E. tenella*. Dans les deux cas, hormis le gain de poids, il s'agit de critères de résistance différents, de mécanismes de résistance multiples et bien que corrélés, sans doute pas tous contrôlés par les mêmes gènes (Pinard-van der Laan et al., 2003). Comme suggéré ici, il faudra très certainement considérer plusieurs QTLs pour améliorer de manière significative un caractère de résistance et plusieurs mécanismes. D'ici là, il faut analyser l'ensemble du génome dans ce dispositif expérimental, puis valider les résultats obtenus dans un contexte commercial tel que les lignées 'label' (Figure 1).

Références bibliographiques

Boyd Y., Goodchild M., Moroll S., Bumstead N., 2001. Immunogenetics, 52 : 294-298.

Darvasi A., Soller M., 1992. Theor. Appl. Genet., 85: 353-359.

Hughes S., Bumstead N., 2000. Anim Genet., 31: 418-419.

Marienfeld R., Nanda I., Zöller B., Schmid M., Rebbert M., Jungwirth C., 1997, J Int Cyt Res., 17: 219-227

Le Roy P., Elsen, J-M., Boichard D., Mangin B., Bidanel J-P., Goffinet B., 1998. in Proc. 6th WCGALP, Armidale, 1998, vol 26, 257-260.

Neau A., Chevalet C., Bibé B., 2000. INRA-Prod. Anim., Numéro Hors-série « Génétique Moléculaire : principes et applications aux populations animales », 197-201.

Pinard-van der Laan, M.-H., Monvoisin, J.L., Péry, P., Hamet, N. and Thomas, M., 1998. Poult. Sci. 77: 185-191.

Pinard-Van der Laan M.-H., Lillehoj H.S., Zhu. J.J., 2003. In: Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology, Muir (éd), Sous presse

Zhu, J.J., Lillehoj, H.S., Allen, P.C., Van Tassell, C. P., Sonstegard, T.S., Cheng, H.H., Pollock, D., Sadjadi, M., Min, W. and Emara, M.G., 2003., Poult. Sci. 82 : 9-16

SELECTION D'UNE SOUCHE DE POULET LABEL CONTRE LE PICAGE : BILAN APRES TROIS GENERATIONS DE SELECTION AU PICOMETRE

Chapuis Hervé [1], Boulay Maryse [1], Retailleau Jean-Philippe [1], Arnould Cécile [2], Mignon-Grasteau Sandrine [2], Berri Cécile [2], Besnard Joël [2], Coudurier Bernard [1], Faure Jean-Michel [2]

[1] SYSAAF, INRA, 37380 Nouzilly
[2] INRA, Station de Recherches Avicoles, Centre de Tours, 37380 Nouzilly

Résumé

Le picomètre est un prototype permettant d'enregistrer le nombre de coups de becs portés à un leurre en plumes présenté à des poules en cages. Il a été utilisé dans une expérience de sélection divergente sur le picage, menée pendant trois générations sur une population de poulets label afin de constituer une lignée d'animaux piqueurs (PIC+) et non piqueurs (PIC-). La dernière génération (n=960) a été élevée au sol dans des conditions favorisant l'apparition du picage afin de valider la sélection. Ces animaux ont subi des mesures d'emplumement sur différentes zones anatomiques, ainsi que des mesures de qualité des viandes (pH, couleur, perte en eau) sur un échantillon de 112 mâles sélectionnés. Si l'état d'emplumement était significativement meilleur chez les PIC+ que chez les PIC-, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour les autres critères. Toutefois, les bonnes valeurs d'héritabilité estimées pour l'état d'emplumement pourraient permettre, si elles étaient confirmées, la mise au point d'un critère de sélection contre le picage aviaire.

Introduction

Chez les oiseaux domestiques, le picage est un trouble du comportement qui consiste à donner des coups de bec au plumage des congénères et à en arracher les plumes, ce qui peut entraîner des blessures. Les coups de bec peuvent engendrer des déclassements de carcasse et, dans des cas extrêmes, entraîner la mort de l'animal par cannibalisme, ce qui nuit à l'image des produits avicoles auprès du consommateur. L'abandon, annoncé pour 2012 en Europe, des cages pour les poules pondeuses au profit des systèmes de ponte dits alternatifs renforce l'acuité du problème, d'autant que les pratiques utilisées aujourd'hui pour prévenir les effets du picage (débecquage, intensité lumineuse réduite au minimum) sont vivement critiquées par les défenseurs du bien-être animal. C'est pourquoi des efforts de recherche sont consacrés à la réduction, par voie génétique, de l'incidence du comportement de picage dans les populations avicoles, une variabilité génétique entre souches ayant été mise en évidence chez le poulet de chair comme chez la poule pondeuse (Bessei, 1984 ; Blockhuis *et al*., 1993 ; Kjaer, 1995 ; Hocking *et al.,* 1999). Pour exploiter cette variabilité, il faut déterminer un critère de sélection efficace et compatible avec les contraintes de la sélection industrielle. Si l'observation directe des animaux permet de sélectionner les animaux (Kjaer, 1999 ; Kathle, 1999), elle est trop lourde à mettre en œuvre. La sélection de familles de poules pondeuses pleines sœurs élevées en cages collectives (Craig et Muir, 1996) permet une sélection indirecte contre le picage, dans la mesure où le critère de sélection utilisé (production d'œuf totale de la cage) tient implicitement compte de la mortalité due au picage. Elle ne permet toutefois pas la mesure *individuelle* des caractères de production, ce qui risque de diminuer le progrès génétique attendu pour ceux-ci. Même en intégrant une analyse de la survie des animaux (Ducrocq *et al.,* 2000), une telle sélection ne contribue à réduire le picage que si un lien fort entre picage et mortalité existe et se maintient au cours de la sélection. Bessei (1997) a mis au point un prototype de mesure, le picomètre, permettant d'enregistrer le nombre de coups de bec donnés par l'animal à un leurre placé devant sa cage. Cet appareil a été utilisé pour une expérience de sélection visant à créer deux populations divergentes piquant beaucoup ou peu le leurre (PIC+ et PIC-). Le critère de sélection était le nombre total de coups de becs portés au leurre - avec une force suffisante pour en déclencher la détection – au cours de 4 passages de 20 minutes réalisés à l'âge de 30 semaines. Après trois générations de sélection réalisées sur l'adulte en cage individuelle, nous avons testé l'existence, sur le terrain, des différences pour le comportement de picage des animaux en croissance élevés au sol.

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériel animal

A l'issue de trois cycles de sélection, deux lots séparés de deux semaines ont été constitués, contenant chacun 240 individus PIC+ et 240 PIC-. Ces animaux ont ensuite été répartis dans 32 cases (16 par lot) de 2,10 m^2. Dans chaque case, les 30 animaux présentaient un niveau génétique aussi homogène que possible. Le modèle d'estimation des valeurs

génétiques picométriques étant un modèle familial (père + mère + arrière grand-père maternel), les animaux étaient grossièrement regroupés par familles. Cette répartition a été choisie afin de mieux observer d'éventuelles différences d'emplumement en relation avec le critère de sélection utilisé, dans une procédure analogue à celle suggérée par Craig et Muir (1996). La répartition géographique dans chaque salle des différentes cases a été effectuée de façon à gommer autant que possible d'éventuels effets de milieu particuliers. L'alimentation (sous forme de granulés) et l'intensité lumineuse (élevée, de l'ordre de 60 lux) étaient choisies afin de favoriser le comportement de picage.

1.2. Mesures effectuées

Le picage a été apprécié indirectement en attribuant des notes d'emplumement à différentes zones anatomiques (poitrail, ailes, dos, croupion). Ces notes présentent une bonne répétabilité (0,87 d'après Tauson *et al.* 1984). Ces mesures ont été effectuées sur tous les animaux à 4, 8 et 12 semaines, au moyen d'une grille de notation (cf. Tableau 1) comportant 8 notes, de 0 (plumage parfait) à 7 (peau totalement dénudée). Un échantillon aléatoire de 8 animaux dans chaque case du lot 1 (soit 128 animaux) a, de plus, subi un pointage hebdomadaire de 3 à 14 semaines.
Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences sur la qualité des viandes, liées à la sélection conduite ou au stress provoqué par le picage chez les animaux les plus atteints, des mesures de pH, de coloration et de perte en eau du filet ont été effectuées sur un échantillon de 112 mâles du premier lot, considérés extrêmes pour l'un ou l'autres des facteurs mentionnés plus haut. Les carcasses de tous les animaux de ce lot ont été examinées afin d'étudier leur aspect et le taux de saisie éventuel.

1.3. Méthodologie utilisée

Le comportement de picage étant un phénomène social, les mesures d'emplumement résultent de l'interaction d'un individu avec ses congénères. En conséquence, les données collectées au sein d'une même case étaient statistiquement dépendantes. De 960 animaux, le nombre d'unités indépendantes se trouvait alors réduit à 32. Compte tenu de la distribution non gaussienne des pointages (la grille de notation étant discrète), il était nécessaire d'utiliser un test non paramétrique (Mann et Whitney, procédure NPAR1WAY de SAS®) afin de tester la significativité des effets introduits dans le modèle. Cette analyse a été complétée par une régression logistique (procédure LOGISTIC de SAS®) basée sur une grille de notation simplifiée avec seulement 3 classes, dont la signification est présentée dans le Tableau 1. Nous avons également utilisé la procédure GLM de SAS® afin de confirmer, pour les variables de qualité des viandes, les tests non paramétriques effectués lors de l'abattage sur un effectif total de n=112 individus. Enfin, les paramètres génétiques de l'état d'emplumement aux différents âges étudiés ont été estimés par REML.

2. Résultats et discussion

Comme on peut le constater sur la Figure 1, où est représenté l'état d'emplumement des 128 animaux suivis chaque semaine, les notes attribuées à la lignée PIC- sont constamment supérieures à celles attribuées aux PIC+, ce qui dénote un plumage paradoxalement en meilleur état dans la lignée sélectionnée pour son comportement piqueur. L'analyse statistique révèle un effet significatif de la lignée pour l'emplumement sur la poitrine, les ailes et le dos à 8 et 12 semaines. Pour le croupion, cet effet disparaît au profit d'un effet sexe très significatif à 8 et 12 semaines (le plumage des mâles étant plus détérioré que celui des femelles). Il semble, de plus, que la notation effectuée à 4 semaines ne soit pas pertinente pour évaluer les dégâts dus au picage, car le duvet encore en place rend délicate la prise de mesure.
La régression logistique, qui exploite la variabilité individuelle des observations, donne de bons résultats, en complet accord avec l'analyse non paramétrique, ainsi qu'en atteste par exemple la Figure 2 où sont représentées les fréquences observées et prédites pour l'emplumement du dos à 12 semaines. Les effets significatifs sont ceux de la lignée (meilleur état du plumage chez les PIC+) et du sexe (le plumage des femelles étant en meilleur état). L'analyse des données individuelles par régression logistique ayant été encourageante, nous avons poursuivi l'étude par une estimation de paramètres génétiques pour les variables d'emplumement aux différents âges, obtenues en sommant les notes recueillies pour chaque zone de pointage. Ces variables synthétiques sont alors considérées comme continues. Les héritabilités estimées sont rassemblées dans le Tableau 2. Ces valeurs très élevées à 8 et 12 semaines laissent espérer un progrès notable pour ces caractères (et donc une réduction des effets visibles du picage) si un effort de sélection conséquent leur était consenti. Il faut toutefois relativiser ces estimations, d'une part car la distribution des variables étudiées ne suit pas une loi normale, et d'autre part car la répartition des animaux de même famille au sein des cases a pu induire une confusion entre effet génétique et effet de milieu. Une seconde expérimentation dans des conditions plus propices à l'estimation des paramètres génétiques est actuellement en préparation.
Les mesures réalisées *post mortem* sur l'échantillon de 112 mâles ne montrent pas de différences significatives entre les animaux présentant les plus grands écarts au niveau de l'emplumement ni entre ceux issus des groupes de niveaux génétiques extrêmes pour l'activité picométrique.

L'analyse de l'appréciation visuelle des carcasses a montré un effet significatif de la lignée pour la présence de sicots (les PIC+ présentant un meilleur aspect que les PIC-, probablement relié au meilleur emplumement des premiers). L'effet sexe est globalement significatif, y compris pour le déclassement des carcasses, mais cette fois les carcasses des femelles étaient en plus mauvais état. Notre interprétation est que l'abattage, qui a eu lieu à 15 semaines, est survenu après l'apparition des premiers signes de maturité sexuelle. L'état des femelles était donc le résultat des tentatives répétées de cochage de la part des mâles qui représentaient 50% des individus.

Conclusion

Cette étude nous a permis de confronter la sélection contre le picage, effectuée en cage au moyen du picomètre, aux réalités du terrain. S'il existe une différence significative de l'état d'emplumement, elle est en faveur des PIC+. Ce résultat paradoxal va néanmoins dans le sens de ceux publiés par van Hierden *et al.* (2002), pour qui les animaux piqueurs concentrent leur activité sur les congénères et non sur l'environnement. Un tel résultat plaide en faveur d'une sélection d'animaux actifs au picomètre afin de réduire le picage. Enfin, les fortes valeurs d'héritabilité estimée pour l'état d'emplumement, si elles étaient confirmées, pourraient conduire les sélectionneurs à utiliser cette mesure comme critère de sélection dans la lutte contre le picage.

Références bibliographiques

Bessei W., 1984. Arch. Geflügelkd. , 48, 231-239.

Bessei W., 1997. In : Proceed. 5th Europ. Symp. Poultry Welfare, Wageningen, 74-76.

Blockhuis H.J., Beuving G., Rommers J., 1993. In : Proceed. 4th Europ. Symp. Poultry Welfare, Edinburgh, 19-26.

Craig J.V., Muir W.M., 1996. Poult. Sci. 75, 294-302.

Ducrocq V., Besbes B ; Protais M.. 2000. Genet. Sel. Evol., 32., 23-40.

van Hierden Y.M, Korte S.M., Ruesink E.W., van Reenen C.G., Engel B., Koolhaas J.M., Blockhuis H.J., 2002. App. Behav. Sc., 77, 183-196.

Kathle J., 1999. In : Rudolf Preisinger (Ed.) Proceed. Poult. Genet. Symp. Mariensee, Germany. p126 (abstract).

Kjaer J.B., 1995. ISAE Meeting. Exeter UK.

Kjaer J.B., 1999 In : Rudolf Preisinger (Ed.) Proceed. Poult. Genet. Symp. Mariensee, Germany. pp 97-103.

Hocking P.M., Channing C.E., Jones R. B., 1999. In : Rudolf Preisinger (Ed.) Proceed. Poult. Genet. Symp. Mariensee, Germany. p119 (abstract).

SAS Institute, 1982. SAS® User's Guide : Statistics.

Tauson R., Elwinger K., Ambrosen T., 1984. Acta Agric. Scand., 34, 400-408.

Remerciements

Les auteurs sont particulièrement reconnaissants à l'ITAVI, à l'OFIVAL et au Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales pour leur soutien financier à ce programme.

Ils remercient également toutes celles et ceux qui ont été sollicités pour participer au protocole expérimental.

TABLEAU 1 : Grille de notation pour l'état d'emplumement

Note	0	1	2	3	4	5	6	7
Surface de la zone dénudée	0	Moins de 3 plumes arrachées		<50%		>50%		100%
Quantité de plumes abîmées	0	<50%	>50%	<50%	>50%	<50%	>50%	-
Classe (grille simplifiée)	**Classe 1**			**Classe 2**		**Classe 3**		

TABLEAU 2 : Héritabilités estimées pour les caractères d'emplumement

Age	h^2
4 semaines	0.13
8 semaines	0.39
12 semaines	0.44
8 + 12 semaines	0.48
4 + 8 + 12 semaines	0.44

FIGURE 1 : Suivi hebdomadaire de l'état d'emplumement

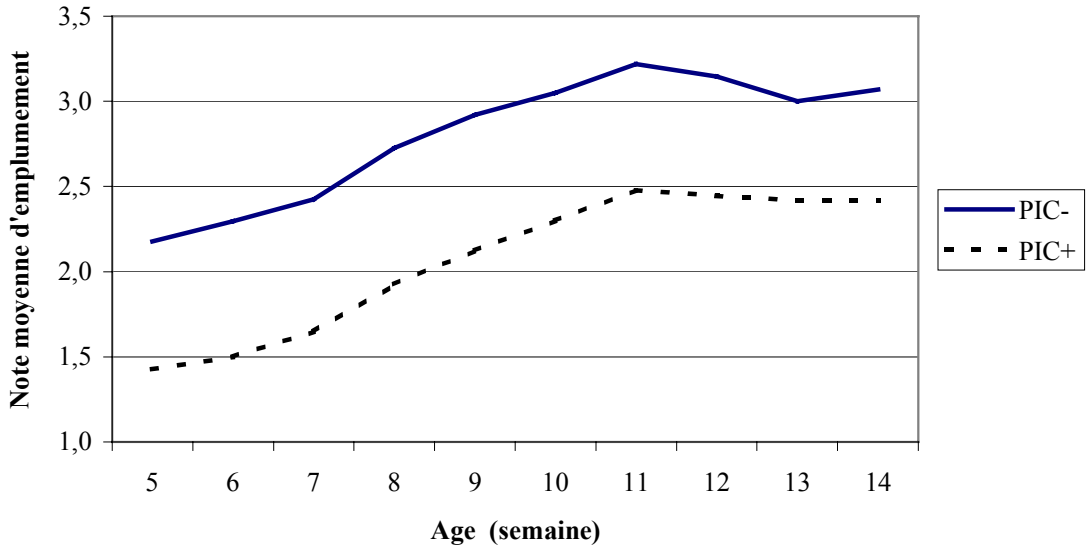
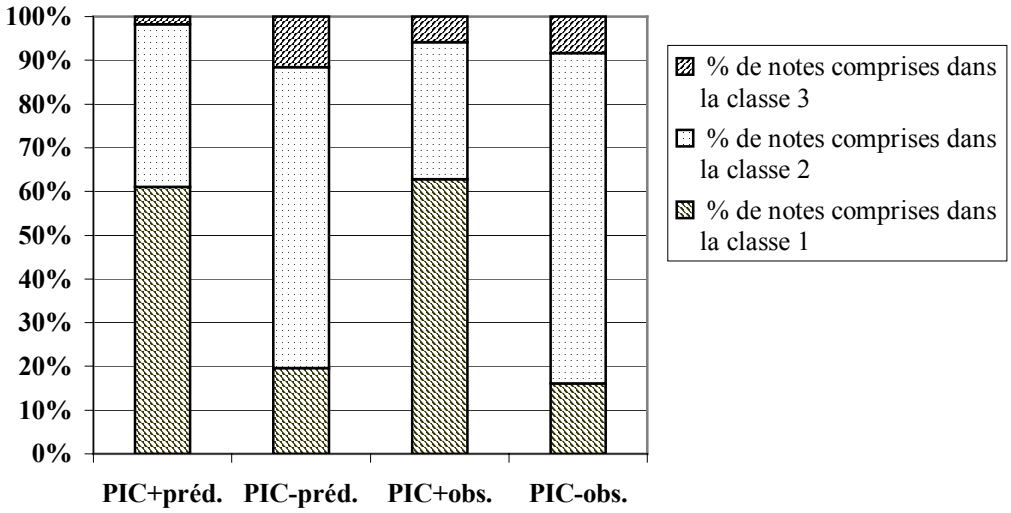


FIGURE 2: Fréquences observées et prédites par régression logistique des différentes classes d'emplumement (cf tableau 1) relevées pour le dos à 12 semaines



UN PANEL D'HYBRIDES IRRADIES ET SON UTILISATION POUR DEVELOPPER UNE CARTE DES GENES DE LA POULE

Morisson Mireille, Jiguet-Jiglaire Carine, Lemière Alexandre, Leroux Sophie, Faraut Thomas, Yerle Martine, Vignal Alain

I.N.R.A. - Laboratoire de Génétique Cellulaire, 31326 Castanet-Tolosan

Résumé

Le développement de cartes comparées entre le génome de la poule et celui de l'homme, permet de tirer parti du grand nombre d'informations disponibles pour ce dernier, notamment pour prédire la localisation de gènes candidats. Afin de produire des cartes comparées de qualité, il est nécessaire de localiser précisément un nombre important de gènes sur le génome de la poule. Pour ce faire, une des techniques les plus performantes à ce jour est l'utilisation de panels d'hybrides cellulaires irradiés : une collection de clones de cellules de hamster contenant des fragments de chromosomes de poulet cassés par irradiation aux rayons X, est utilisée pour analyser par PCR la rétention de locus représentant les gènes. Plus deux fragments sont proches dans le génome, plus leur fréquence de co-rétention dans les clones sera grande. Des cartes sont ainsi produites, avec des distances exprimées en cR (centiRay), reflétant la proportion de cassures induites par les radiations, détectées entre deux marqueurs. Nous présentons ici une carte du chromosome 7 de poule, comparée au chromosome humain 2q14-q37.

Introduction

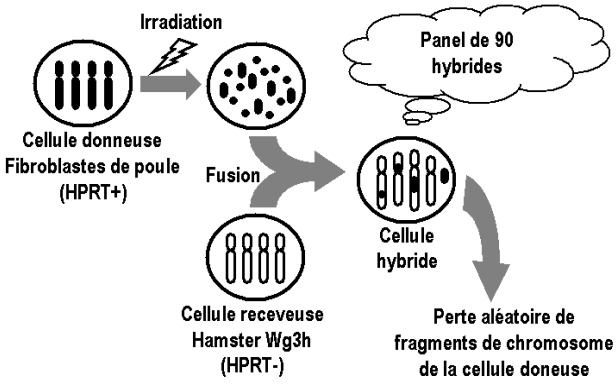
La connaissance du génome de la poule progresse rapidement, grandement aidée par la disponibilité d'outils performants : une carte génétique comprenant plus de 2 000 marqueurs (Schmid et al., 2000) ; des banques de clones BAC (Bacterial Artificial Chromosome) représentant plus de 15 équivalents du génome, en cours de cartographie physique par la méthode des fingerprints (http://hbz.tamu.edu/bacindex1.html ; Groenen, 2002, communication personnelle) ; ainsi que des données de cartographie comparées avec des espèces séquencées (homme, souris), basées sur la localisation de 660 gènes sur le génome (http://www.thearkdb.org). Par ailleurs, le développement d'étiquettes de gènes, appelées EST (Expressed Sequence Tags), utilisées pour les études du transcriptome (Morgan et al., 2001), est bien avancé, avec près de 400 000 EST déjà disponibles, permettant dans un premier temps le choix d'amorces pour la PCR (Buerstedde et al., 2002 ; http://chick.umist.ac.uk/ ; http://www.chickest.udel.edu/).

Dans ce contexte, un panel d'hybrides irradiés est un nouvel outil de valeur pour le développement des cartes, car il permet d'obtenir une résolution intermédiaire entre les cartes génétiques et les contigs de clones BAC, en réalisant de simples PCR. Ce dernier point est particulièrement intéressant pour localiser des gènes, car il n'est plus nécessaire de développer des marqueurs polymorphes comme pour les cartes génétiques. Le principe général de la cartographie par hybrides irradiés, est de tester la co-rétention de marqueurs par PCR sur de très petits fragments chromosomiques. Ces fragments sont obtenus par irradiation aux rayons X ou gamma, générant de nombreuses cassures dans les chromosomes.

1. Fabrication du panel de clones d'hybrides irradiés

Des fibroblastes diploïdes de 6 embryons de poules femelles (ZW), ont été irradiés par une dose létale de 6 000 rad (rayons gamma d'une source Césium 137), afin de fractionner les chromosomes, puis ont été

FIGURE 1 : Fabrication des clones d'hybrides irradiés



fusionnés à une lignée receveuse Wg3hCl2 de hamster, déficiente pour le gène *HPRT* (Echard et al., 1984). La sélection pour les colonies hybrides, contenant le gène *HPRT* de poule, a été réalisée en utilisant du milieu de culture HAT (Figure 1). Le but étant d'obtenir une collection de 90 clones hybrides ayant retenu chacun une proportion satisfaisante (autour de 20 %) du génome de la poule, un total de 452 clones ont été produits et un test de rétention de fragments du génome a été réalisé par PCR à l'aide de marqueurs microsatellites choisis d'après leur répartition sur la carte génétique (Figure 2).

Les 103 clones sélectionnés ont été cultivés à grande échelle, afin de produire une grande quantité d'ADN nécessaire au génotypage PCR d'un grand nombre de marqueurs. Des pertes de fragments chromosomiques ayant lieu lors des cultures, la rétention des fragments de génome de poule à de nouveau été testée et les 90 meilleurs clones retenus pour le panel final. Les détails supplémentaires sur la fabrication et la caractérisation du panel, appelé ChickRH6, sont décrits dans Morisson et al., 2002.

FIGURE 2 : fraction du génome de poule retenu dans les hybrides produits

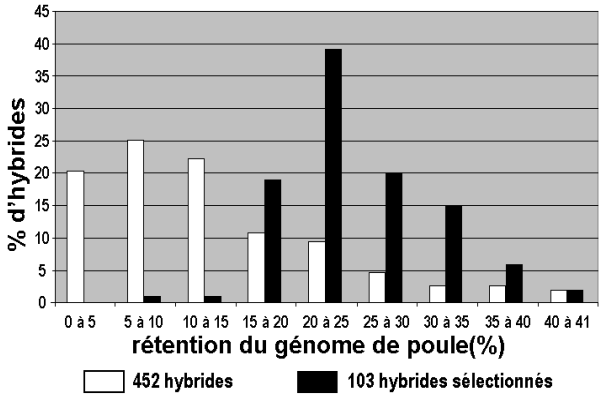
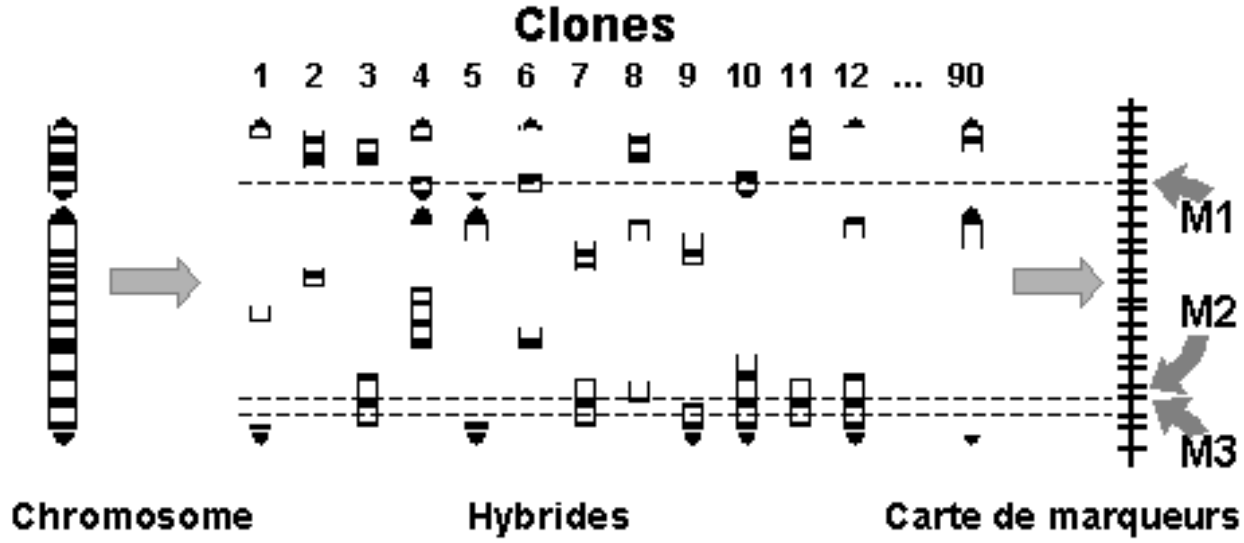


FIGURE 3 : Cartographie de marqueurs par PCR sur un panel d'hybrides irradiés



Résultats PCR														
Hybr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	...	90
M1	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-		-
M2	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-		-
M3	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-		-

2. Utilisation du panel pour la cartographie

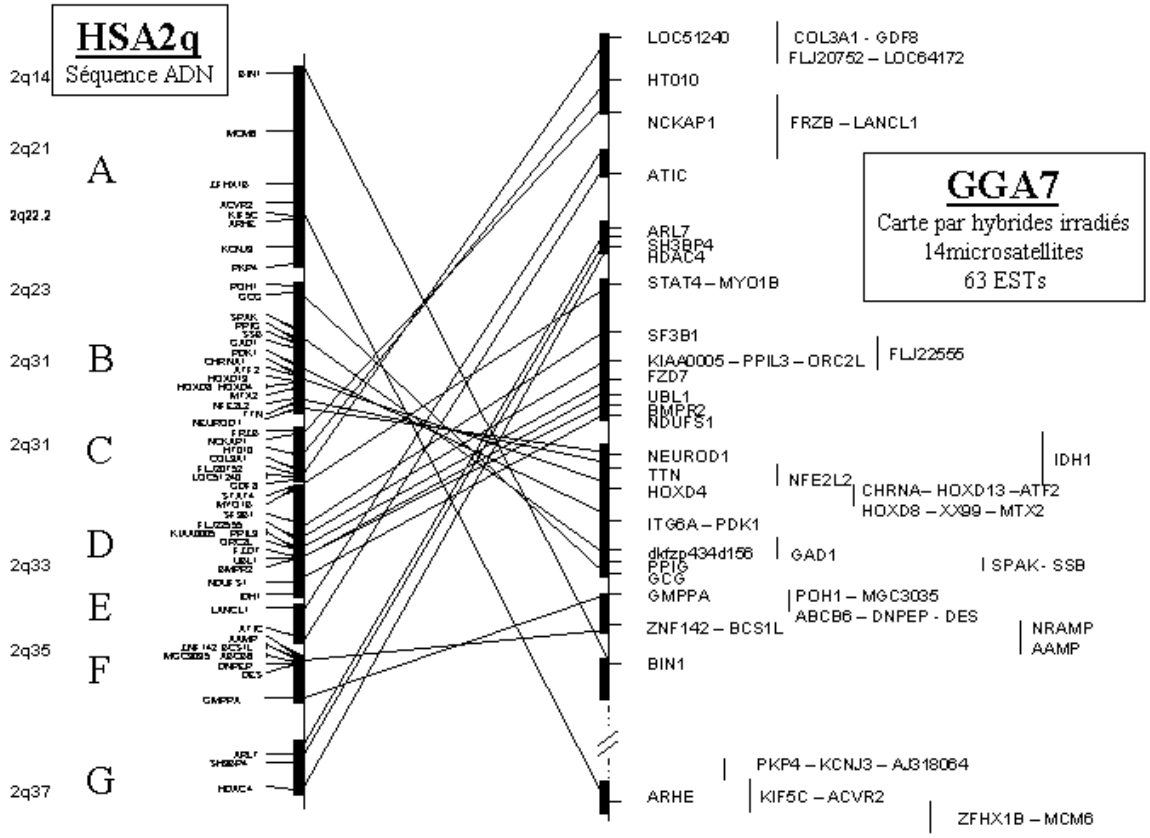
Le principe de la cartographie de marqueurs à l'aide d'un panel d'hybrides irradiés est illustré Figure 3. Pour chaque marqueur de poule à cartographier, la présence ou l'absence de la région chromosomique correspondante dans chaque clone, est vérifiée par PCR. Deux marqueurs sont considérés liés si ils sont retenus dans les mêmes clones à une fréquence plus élevée que ne le prévoirait le hasard (test de maximum de vraisemblance). Les distances sont une fonction du nombre de cassures chromosomiques observées entre marqueurs liés et sont exprimées en centiRays (cR), avec 1cR = 1 % de cassures entre deux marqueurs. Dans l'exemple de la Figure 3, le marqueur M1 est considéré indépendant des marqueurs M2 et M3, tandis que M2 et M3 sont liés. En effet, sur les 12 clones de la figure, les résultats PCR indiquent 3 cas où M2 et M3 sont retenus ensemble et 2 cas où ils sont séparés par une cassure.

Remarque : les centiRays ne correspondent pas à une mesure physique en paires de bases constante et varie d'un panel à un autre, car leur valeur dépend de la dose de radiation. Dans le cas de notre panel, une dose de 6 000 rads a été utilisée. Nous avons donc ici $1cR_{6000}$ = 1 % de cassure à une dose de 6 000 rads. L'utilisation d'une dose d'irradiation plus élevée lors de la fabrication du panel aurait permis d'obtenir une résolution plus élevée par une augmentation du nombre de cassures. Cependant, sa réalisation aurait été rendue plus compliquée, voire compromise, du fait d'une rétention plus faible des chromosomes de poule. De plus, dans le cas d'un panel à résolution élevée, une densité plus importante de marqueurs est nécessaire à l'établissement des groupes de liaison.

3. Cartographie du chromosome 7 de la poule (GGA7)

Comme premier test d'utilisation du panel d'hybrides irradiés, nous avons réalisé une carte du chromosome 7

FIGURE 4 : Carte comparée entre HSA2q et GGA7
Les chromosomes sont présentés selon la nomenclature internationale, avec le bras court vers le haut



de la poule (GGA7). Le génotypage PCR étant du type oui/non, nous avons testé chaque marqueur lors de deux expériences indépendantes. En cas de discordance, le génotypage a été réalisé une troisième fois. Tout d'abord, les marqueurs microsatellites de la carte génétique ont été utilisés, afin de s'assurer de points d'ancrage sur le groupe de liaison GGA7. Ensuite, pour densifier la carte en marqueurs ainsi que pour pouvoir la comparer à la carte humaine, des marqueurs supplémentaires ont été développés à partir d'EST de poule, dont les gènes orthologues sont localisés sur la carte humaine dans la région du bras long du chromosome 2 (HSA2q), pour laquelle une conservation de synténie avait déjà été démontrée (Schmid et al., 2000). Au total, 14 microsatellites et 63 EST ont été localisés (Figure 4). L'ordre des marqueurs microsatellites correspond à celui de la carte génétique, indiquant la validité de la méthode pour ordonner des marqueurs. En comparant la carte de transcrits réalisée avec la carte humaine, on confirme bien l'existence d'une conservation de synténie entre la totalité de GGA7 et HSA2q, mais on met en évidence des réarrangements internes jusqu'ici non décrits, les deux chromosomes présentant 7 blocs de conservation d'ordre des gènes (Figure 4).

Conclusion

Nous avons réalisé un panel d'hybrides irradiés et avons démontré son utilité pour la réalisation d'une carte du chromosome 7 de la poule. La comparaison avec la carte humaine a particulièrement bien mis en évidence la nécessité d'une carte détaillée présentant un grand nombre de gènes, permettant de détecter les réarrangements ayant eu lieu au cours de l'évolution. En effet, si la localisation de nombreux gènes sur le génome de la poule permet de générer directement des candidats positionnels, la connaissance fine des régions présentant une conservation de l'ordre des gènes entre les espèces, permet d'améliorer les prédictions de localisation des autres gènes. la position d'un gène sur le génome de la poule, peut être déduite d'après sa position sur la séquence du génome humain.

Lexique

BAC (Bacterial Artificial Chromosome) : chromosomes artificiels de levure
EST (Expressed Sequence Tags) : étiquette de séquence exprimée
GGA : *Gallus gallus*
HAT : milieu de sélection contenant de l'hypoxanthine, de l'aminopterine, et de la thymidine, létal pour les cellules *HPRT*-.
HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransferase. La déficience pour le gène HPRT entraîne une sensibilité au milieu HAT.
HSA : *Homo sapiens*

Références bibliographiques

Schmid M., Nanda I., Guttenbach M., Steinlein C., Hoehn M., Schartl M., Haaf T., Weigend S., Fries R., Buerstedde J.M., Wimmers K., Burt D.W., Smith J., A'Hara S., Law A., Griffin D.K., Bumstead N., Kaufman J., Thomson P.A., Burke T., Groenen M.A., Crooijmans R.P., Vignal A., Fillon V., Morisson M., Pitel F., Tixier-Boichard M., Ladjali-Mohammedi K., Hillel J., Maki-Tanila A., Cheng H.H., Delany M.E., Burnside J. ,Mizuno S. 2000. Cytogenetics and Cell Genetics, 90, 169-218.
Morgan R.W., Sofer L., Anderson A.S., Bernberg E.L., Cui J. ,Burnside J. 2001. J Virol, 75, 533-9.
Buerstedde J.M., Arakawa H., Watahiki A., Carninci P.P., Hayashizaki Y.Y., Korn B. ,Plachy J. 2002. Nucleic Acids Res, 30, 230-1.
Echard G., Gellin J. ,Gillois M. 1984. Génétique Sélection Evolution, 16, 261-270.
Morisson M., Lemiere A., Bosc S., Galan M., Plisson-Petit F., Pinton P., Delcros C., Feve K., Pitel F., Fillon V., Yerle M. ,Vignal A. 2002. Genet Sel Evol, 34, 521-33.

LA CARTE CYTOGENETIQUE DU POULET : UN MOYEN POUR IDENTIFIER LES MICROCHROMOSOMES ET POUR COMPARER LES GENOMES AVIAIRES

Fillon Valérie[1], Vignoles Matthieu[1], Garrigues Alexandrine[1], Frédérique Pitel, Mireille Morisson Crooijmans Richard[2], Groenen Martien[2], Gellin Joël[1], Vignal Alain[1]

[1] Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA de Toulouse-Auzeville, BP27, 31326 Castanet Tolosan,
[2] Animal Breeding and Genetics group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, 6709 PG Wageningen, The Netherlands,

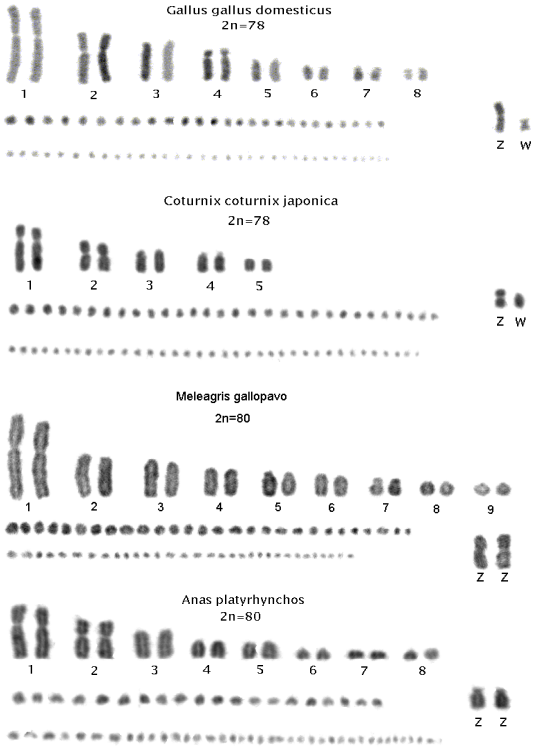
Résumé

Ces dernières années, des collaborations internationales ont conduit à l'établissement d'une carte génétique chez la poule dans le but d'accéder à des QTL (pour Quantitative Trait Loci) puis à des gènes d'intérêt agronomique. Pour attribuer à chaque chromosome un contenu génétique, nous avons réalisé une carte cytogénétique en localisant une centaine de marqueurs moléculaires à la fois sur les groupes de liaison de la carte génétique et sur les chromosomes. Nous avons également identifié 22 paires de microchromosomes par des marqueurs moléculaires fluorescents. L'établissement de cartes génétiques est actuellement en cours chez d'autres espèces avicoles (dinde, caille, canard). Afin de pouvoir bénéficier des informations génétiques de la poule, nous avons établi plus précisément les correspondances chromosomiques entre ces espèces en localisant une cinquantaine de marqueurs de la carte cytogénétique de la poule chez les autres espèces. Des homologies importantes ont été démontrées. Elles permettront de tirer parti de façon optimale des connaissances génétiques accumulées chez la poule.

Introduction

Le génome de la Poule fait l'objet depuis plusieurs années d'une étude de cartographie génomique approfondie dans le but d'accéder à des gènes correspondant aux QTL (Quantitative Trait Loci) d'intérêt zootechnique (Tixier-Boichard et al., 1997 ; Vignal, 1997 ; Groenen et al., 2000 ; Productions Animales, numéro hors série Octobre 2000);. La carte génétique consensus de la poule, comporte actuellement près de 2000 marqueurs couvrant 3800 cM, répartis en 50 groupes de liaison (Groenen et al., 2000 ; Schmid et al., 2000). Le caryotype du poulet comporte 78 chromosomes (2n=78) répartis en 9 paires de macrochromosomes (dont les gonosomes ZZ pour les mâles ou ZW pour les femelles) comparables en taille à des chromosomes de mammifères, et en 30 paires de microchromosomes quasiment indiscernables les uns des autres (figure 1). La standardisation du caryotype de la poule n'a donc pas pu être précisée au delà de la huitième paire d'autosomes (Ladjali-Mohammedi et al., 1999).
Les microchromosomes sont typiques des génomes d'oiseaux, et leur importance génétique est loin d'être négligeable (Fillon, 1998). En effet, ils représentent environ un quart à un tiers du génome total alors qu'ils contiennent plus de 50% des gènes (Burt, 2002). Pourtant, un problème majeur de la réalisation des cartes génétiques est qu'il est pour l'instant très difficile d'attribuer à chaque paire de

FIGURE 1 : Les caryotypes de la poule (2n=78), du Canard commun (2n=80) (Denjean et al., 1997), de la Caille (2n=78) (Schmid et al., 1989), de la Dinde (2n=80) (Ryttman and Tegelström, 1981) présentent une organisation similaire, typique des caryotypes aviaires



microchromosomes un contenu génétique (groupe de liaison) puisqu'il est impossible de les identifier.
Par ailleurs, l'établissement de cartes génomiques est en cours chez d'autres espèces avicoles (caille, canard). Cette entreprise est fastidieuse, c'est pourquoi l'INRA a initié en 1998 une étude de cartographie comparée chez les volailles. Ce projet visait à établir des correspondances chromosomiques aussi précises que possible entre le génome de la poule et ceux de la dinde, la caille et le canard commun (figure 1). La mise en évidence des conservations de synténies (fragments chromosomiques portant les mêmes gènes dans deux espèces différentes) permettra ainsi de bénéficier des données détaillées disponibles chez la Poule pour aider à la construction et à l'utilisation de ces nouvelles cartes.

1. Stratégie

Une carte cytogénétique a été réalisée avec 130 clones PAC (P1-derived Artificial Chromosome) ou BAC (Bacterial Artificial Chromosome), provenant de banques d'ADN génomiques à grandes insertions (Zoorob et al., 1996 ; Crooijmans et al., 2000). La plupart d'entre eux contient un marqueur génétique qui intégre les informations des cartes génétiques et cytogénétique, un marqueur pouvant être placé à la fois sur les chromosomes et sur les groupes de liaison (Morisson et al., 1998 ; Schmid et al., 2000 ; Smith et al., 2000). La technique de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet de les visualiser sous forme de signaux fluorescents directement sur les chromosomes métaphasiques observés au microscope photonique.
Pour identifier les microchromosomes, des combinaisons d'hybridation in situ en double couleur ont été réalisées (Fillon et al., 1997 ; Fillon et al., 1998).
Afin de déterminer plus précisément les correspondances caryotypiques, nous avons choisi des marqueurs cytogénétiques jalonnant les macrochromosomes afin de mettre en évidence d'éventuels remaniements chromosomiques. Pour les microchromosomes, nous avons utilisé des marqueurs permettant l'identification des microchromosomes de Poule par FISH (Fillon et al., 1997 ; Fillon et al., 1998). Quand plusieurs marqueurs étaient disponibles pour un petit groupe de liaison correspondant à un microchromosome, seuls les marqueurs de chaque extrémité ont été retenus et hybridés simultanément afin d'en vérifier la conservation globale entre les espèces.

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparations chromosomiques

Les chromosomes ont été obtenus à partir de cultures cellulaires de fibroblastes d'embryon puis bloqués en métaphase par 0,06 µg/mL de colcémide (Gibco). Le choc hypotonique est réalisé classiquement avec du sérum de veau fœtal dilué (1:5), puis les cellules métaphasiques sont fixées par un mélange d'éthanol et d'acide acétique (3:1) et étalées sur des lames porte-objet.

2.2. FISH en simple couleur

Selon la technique décrite par Yerle et al. (Yerle et al., 1992), les sondes sont marquées à la biotine par incorporation de biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics) et resuspendues dans un tampon d'hybridation à 40% de formamide (caille et canard) et 30% de formamide (dinde). Après une hybridation de 48 heures à 37°C, les sondes sont révélées en vert par de l'avidine-fluoresceine isothiocyanate (FITC, Vector) et les chromosomes sont colorés en rouge par de l'iodure de propidium (Sigma) ajouté au milieu de montage (Vectashield, Vector).

2.3. FISH en double couleur

Pour chaque microchromosome, deux sondes marquées par l'incorporation de digoxigénine (digoxigenin-11-dUTP, Roche Diagnostics) ou de biotine (biotine-16-dUTP, Roche Diagnostics) sont hybridées simultanément. Les sondes marquées à la biotine sont ensuite révélées en rouge avec de l'avidine-Texas red (Vector), alors que celles ayant incorporé de la digoxigénine sont détectées par du FITC de couleur verte (Roche Diagnostics) (Trask et al., 1991). Les chromosomes sont colorés en bleu par du DAPI (4', 6-diamidino-2-phénilindole-dihydrochloride, Sigma) ajouté au milieu de montage (Vectashield, Vector).

2.4. Observation des lames

Les lames sont observées avec un microscope Zeiss (objectif à immersion, grossissement 100). Les images sont saisies avec une caméra CCD et analysées avec le logiciel « Cytovision » (Applied Imaging).

3. Résultats

3.1. Identification des microchromosomes

22 des 30 paires de microchromosomes ont été identifiées par des clones BAC criblés pour des marqueurs microsatellites de la carte génétique consensus (tableau 1). Dans 3 cas (paires 14, 17, 20), deux groupes de liaison ont été mis en relation avec un microchromosome. Ces résultats confirment que malgré leur petite taille, les microchromosomes ont une grande taille génétique.

TABLEAU 1 : Etablissement d'une nomenclature de référence pour 22 paires de microchromosomes identifiés

Clones	Marqueurs génétiques	Groupes de liaison	Numéro chr.
P1A6	GCT16	E36C06W08	9
bw8G10	MCW132	E29C09W09	10
bw29L10	MCW97	E30C14W10	11
bw11C21	MCW332	E16C17W22	12
P3-1	GCT907	E48C28W13W27	13
P1-8	GCT903	E35C18W14 + C37	14
P3C6	GCT14	E18C15W15	15
bw65G9	MCW371	Ch16	16
bw8L2	ADL293	E41W17 + C24	17
Fc16	FASN	E31E21C25W12	18
ACC	ACACA	E52W19	19
bw4B12	ADL324	E47W24 + E32	20
bw24C7	AGRN	E54	21
bw32L22	ROS73	E38	22
bw28L18	MCW249	E27C36W25W26	23
P2-4	GCT905	E49C20W21	24
P2-7	GCT906	E60E04W23	26
P10G12	GCT22	E59C35W20	27
P2-3	GCT904	E53C34W16	28
gB5F5	no	no	29
pB5F5	no	no	30
c19-12	no	no	31

3.2. Carte cytogénétique comparée aviaire

La très bonne conservation des génomes aviaires, y compris pour la fraction des microchromosomes (tableau 2) a été démontrée malgré la caractérisation de quelques remaniements intrachromosomiques pour les macrochromosomes ou des évènements de fusion/fission(tableau 3). Des réarrangements interchromosomiques de type translocation n'ont jamais été observés

TABLEAU 2 : Résultats obtenus pour les microchromosomes. La majorité des sondes de microchromosomes de poule ont donné des signaux d'hybridation chez les autres espèces, tous localisés sur des microchromosomes. La conservation de plusieurs groupes de liaison a été démontrée

	Nombre de sonde testées	Nombre de groupes de liaison conservés
Caille	20/20	7
Dinde	23/28	9
Canard	29/34	7

TABLEAU 3 : Correspondances entre les macrochromosomes de poule *(Gallus gallus domesticus*), caille (*Coturnix coturnix*), dinde (*Meleagris gallopavo*) et canard (*Anas platyrhynchos*).
Inversion : remaniement autour du centromère.
Réarrangement : l'ordre des marqueurs n'est pas conservé et signe donc un remaniement intrachromosomique.
Nombre de sondes : nombre de marqueurs testés en hybridation hétérologue. Un très petit nombre d'entre eux n'a permis d'obtenir aucun résultat.

Macrochromosomes de poule	**Macrochromosomes de caille**	**Macrochromosomes de dinde**	**Macrochromosomes de canard**
1	1 (inversion)	1 (réarrangements)	1
2	2 (inversion)	3 + 6	2
3	3	2	3
4	4 (inversion)	4 (sans le bras p)	4 (réarrangements et sans bras p)
5	5	5 (avec un bras p)	5 (réarrangements)
6	6	8	6 (réarrangements)
7	7 (réarrangements)	7	7 (réarrangements)
8	8 (inversion)	9	8 (réarrangements)
Z	Z	Z (inversion)	Z (réarrangements)
Nombre de sondes	**28/29**	**43/48**	**25/26**

Conclusion

Les caryotypes aviaires apparaissent comme très stables d'une espèce à l'autre (Shetty et al., 1999 ; Suzuki et al., 1999 ; Fillon et al., 2001) à la différence de ce qui est décrit chez les mammifères (Goureau et al., 1996 ; Chowdhary et al., 1998 ; Burt et al., 1999 ; Pinton et al., 2000). Si ces résultats soulèvent bien sûr d'intéressantes questions d'évolution, ils permettent réellement d'envisager l'utilisation de la carte génétique de la poule pour faire progresser la génétique moléculaire chez d'autres espèces de volaille. La faible fréquence de réarrangements observée laisse présumer d'une excellente conservation des gènes d'une espèce à l'autre. Le développement d'un réseau minimum de marqueurs spécifiques à partir des marqueurs moléculaires de poule est donc envisageable. Par ailleurs, lors de l'étude plus fine de gènes ou de QTL, il sera possible de prédire directement la région concernée d'une espèce à l'autre sans passer par l'analyse préalable de tout le génome, bien plus longue et plus coûteuse.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce aux financements européens obtenus dans le cadre des projets européens « ChickMap » (contrat EC n° BIO4-CT95-0287) et « Avianome » (contrat EC n° BIO4-CT98-0288).

Références bibliographiques

Département de Génétique Animale, 2000. *In* : Prod. Animales (INRA éditions), pp262.

Burt D.W., 2002. Cytogenet. Genome Res., 96., 97-112.

Burt D.W., Bruley C., Dunn I.C., Jones C.T., Ramage A., Law A.S., Morrice D.R., Paton I.R., Smith J., Windsor D., Sazanov A., Fries R. and Waddington D., 1999. Nature, 402. 411-413.

Chowdhary B.P., Raudsepp T., Fronicke L. and Scherthan H., 1998. Genome Res., 8., 577-589.

Crooijmans R.P., Vrebalov J., Dijkhof R.J., van der Poel J.J. and Groenen M.A., 2000. Mamm. Genome, 11., 360-363.

Denjean B., Ducos A., Darré A., Pinton A., Séguela A., Berland H., Blanc M.F., Fillon V. and Darré R., 1997. Rev. Méd. Vét., 148., 695-704.

Fillon V., 1998. Genet. Sel. Evol., 30., 209-219.

Fillon V., Morisson M., Zoorob R., Auffray C., Douaire M., Gellin J. and Vignal A., 1998. Chromosome Res., 6., 307-313.

Fillon V., Morisson M., Zoorob R., Auffray C., Douaire M. and Vignal A., 1997. Deuxièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, France, 8-10 avril, 57-60.

Fillon V., Vignoles M., Crooijmans R., Groenen M., Séguéla A., Gellin J. and Vignal A., 2001. 4ème Journées de la Recherche Avicole, Nantes, 27-29 mars, 365-368.

Goureau A., Yerle M., Schmitz A., Riquet J., Milan D., Pinton P., Frelat G. and Gellin J., 1996. Genomics, 36., 252-262.

Groenen M.A., Cheng H.H., Bumstead N., Benkel B.F., Briles W.E., Burke T., Burt D.W., Crittenden L.B., Dodgson J., Hillel J., Lamont S., de Leon A.P., Soller M., Takahashi H. and Vignal A., 2000. Genome Res., 10., 137-147.

Ladjali-Mohammedi K., Bitgood J.J., Tixier-Boichard M. and Ponce De Leon F.A., 1999. Cytogenet. Cell Genet., 86., 271-276.

Morisson M., Pitel F., Fillon V., Pouzadoux A., Berge R., Vit J.P., Zoorob R., Auffray C., Gellin J. and Vignal A., 1998. Anim. Genet., 29., 348-355.

Pinton P., Schibler L., Cribiu E., Gellin J. and Yerle M., 2000. Mamm. Genome, 11., 306-315.

Ryttman H. and Tegelström H.H., 1981. Hereditas, 94., 165-170.

Schmid M., Enderle E., Schlindler D. and Schempp W., 1989. Cytogenet. Cell Genet., 52., 139-146.

Schmid M., Nanda I., Guttenbach M., Steinlein C., Hoehn M., Schartl M., Haaf T., Weigend S., Fries R., Buerstedde J.M., Wimmers K., Burt D.W., Smith J., A'Hara S., Law A., 2000. Cytogenet. Cell Genet., 90., 169-218.

Shetty S., Griffin D.K. and Graves J.A., 1999. Chromosome Res., 7., 289-295.

Smith J., Paton I.R., Bruley C.K., Windsor D., Burke D., Ponce de Leon F.A. and Burt D.W., 2000. Anim. Genet., 31., 20-27.

Suzuki T., Kansaku N., Kurosaki T., Shimada K., Zadworny D., Koide M., Mano T., Namikawa T. and Matsuda Y., 1999. Cytogenet. Cell Genet., 87., 22-26.

Tixier-Boichard M., Douaire M., Beaumont C. and Elsen J.M., 1997. Deuxièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, France, 8-10 avril 1997, 41-48.

Trask B.J., Massa H., Kenwrick S. and Gitschier J., 1991. Am. J. Hum. Genet., 48. 1-15.

Vignal A., 1997. Deuxièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, France, 8-10 avril 1997, 49-58.

Yerle M., Galman O., Lahbib-Mansais Y. and Gellin J., 1992. Cytogenet. Cell Genet., 59., 48-51.

Zoorob R., Billault A., Severac V., Fillon V., Vignal A. and Auffray C., 1996. Proceedings of the 25th Conference of the International Society for Animal Genetics, Tours, France, 69.

ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES DE LA QUALITE TECHNOLOGIQUE DE LA VIANDE DE POULET EN RELATION AVEC LE GENOTYPE ET LE STRESS AVANT ABATTAGE

Martine Debut [1], Cécile Berri [1], Elisabeth Baéza [1], Nadine Sellier [1], Cécile Arnould [1], Daniel Guéméné [1], Nathalie Jehl [2], Bruno Boutten [3], Catherine Beaumont [1], Elisabeth Le Bihan-Duval [1]

[1] INRA - SRA, 37380 Nouzilly,
[2] ITAVI - 28 rue du Rocher, 75008 Paris,
[3] CTSCCV - 7 Avenue Charles De Gaulle, 94704 Maisons- Alfort

Résumé

L'objectif de notre étude était d'obtenir, chez le Poulet, une première estimation de la variabilité de la qualité technologique de la viande en fonction du génotype et des conditions de pré-abattage. Des poulets issus de deux souches grand-parentales se différenciant sur leur vitesse de croissance ont été placés face à deux types de stress, thermique ou de transport, avant leur mort. Les résultats de cette étude confirment l'importance de la cinétique de chute du pH *post-mortem* sur la qualité de la viande de poulet. Le pH ultime influence fortement le rendement technologique, l'exsudat et la luminosité des muscles de la cuisse et du filet. La vitesse de chute du pH influence, mais de façon plus modérée, l'exsudat et la teinte rouge du filet. Des différences importantes entre souches sont mises en évidence aussi bien en terme de qualité de la viande que de comportement sur la chaîne d'abattage. Une relation significative entre l'activité des animaux sur la chaîne d'abattage et certains indicateurs de qualité de la viande est observée, l'activité plus soutenue des poulets à croissance lente apparaissant préjudiciable à la qualité de leur viande. Par ailleurs, cette étude fait ressortir un impact des conditions de pré-abattage limité aux muscles de la cuisse, le stress thermique et de transport ayant des effets opposés sur le pH ultime.

Introduction

La consommation de produits transformés à base de volailles étant en forte augmentation (Magdelaine et Philippot, 2000), la qualité technologique de la viande est devenue un critère important dans les filières de production de Dinde et de Poulet. Les premières études génétiques sur la qualité de la viande de volailles montrent que, comme chez le Porc, les critères classiques d'évaluation de la qualité (pH, couleur, pouvoir de rétention en eau) présentent des héritabilités significatives. C'est en particulier le cas chez le Poulet où des héritabilités élevées, comprises entre 0.35 et 0.57, ont été obtenues pour ces différents indicateurs mesurés en conditions expérimentales (LeBihan-Duval *et al.*, 2001). Chez la Dinde, une héritabilité plus faible (de l'ordre de 0.20) de la vitesse de chute de pH est obtenue pour des animaux abattus en conditions industrielles (Le Bihan-Duval *et al.*, 2002). Ces premiers travaux suggèrent des déterminismes génétiques de la qualité de la viande différents dans les deux espèces étudiées et/ou des interactions avec les conditions de pré-abattage. On connaît peu de choses à ce jour sur l'importance relative du génotype et du stress avant abattage, ainsi que de leur éventuelle interaction, sur la qualité de la viande de volaille. L'objectif de cette étude était donc de décrire la variabilité de la qualité technologique de la viande chez deux souches de Poulet se différenciant sur leurs performances de croissance et placées dans des conditions de pré-abattage supposées refléter des niveaux et/ou des types de stress différents.

1. Matériels et méthodes

1.1. Animaux

Cette étude a porté sur des femelles issues de deux souches grand-parentales à croissance lente ou rapide. Les animaux ont été abattus aux âges classiques de commercialisation des deux types de souches, soit 6 semaines pour les animaux à croissance rapide et 12 semaines pour ceux à croissance lente. Au total, 180 animaux ont été utilisés, soit 30 par combinaison génotype × condition de pré-abattage.

1.2. Conditions de pré-abattage

Avant leur abattage, les animaux ont été soumis soit à un stress thermique (deux heures dans une cellule chauffée à 35°C), soit à un stress de transport (deux heures dans une camionnette) ou placés dans des conditions « témoins » minimisant le stress avant l'abattage. Ces deux types de stress ont été retenus car selon des travaux précédents, ils ont des effets plutôt défavorables sur la qualité de la

viande. Par ailleurs, ils correspondent à deux types de stress pouvant être rencontrés sur le terrain.

1.3. Caractéristiques musculaires et critères de qualité de la viande

Le pH à 15 minutes *post-mortem*, le pH ultime à 24h *post-mortem*, la couleur (luminosité, indice de rouge et indice de jaune), la perte en eau par exsudation et le rendement à la cuisson de type Napole (Naveau, 1985) ont été mesurés sur le *Pectoralis major* (filet) et l'*Iliotibialis* (cuisse), deux muscles aux métabolismes énergétiques différents (Smith et Fletcher, 1988).

1.4. Mesures comportementales

Le comportement des animaux sur la chaîne d'abattage a été apprécié par différents critères : présence ou absence de redressement du corps (tête au dessus des pattes), de vocalisations, de battements d'ailes au moment de l'accrochage (durée initiale) ou entre l'accrochage et l'électronarcose (durée totale). Pour estimer le niveau d'« émotivité » des animaux, un test d'immobilité tonique (IT) a été réalisé une semaine avant l'abattage.

1.5. Analyses statistiques

L'ensemble des mesures de qualité et de « comportement » disponibles sur les animaux abattus ont été analysées par une Analyse en Composantes Principales (ACP) grâce au logiciel SPAD (Cisia, Montreuil, France). Les mesures de qualité de viande, de distribution normale, ont été introduites en tant que variables actives participant à la définition des axes de l'ACP. La distribution des mesures de comportement pour l'IT et les battements d'ailes n'étant pas normale, celles-ci ont été transformées en classes. Les facteurs de variation de la qualité comme la souche et le type de traitement de pré-abattage (transport, chaleur ou condition témoin) subi par l'animal ainsi que les variables de comportement ont été introduites comme des variables illustratives, dont la position moyenne est donnée *à posteriori* sur les axes de l'ACP mais qui ne participent pas à leur calcul.
L'effet de la souche, des conditions de pré-abattage et leur éventuelle interaction sur les critères de qualité de viande ont ensuite été testés par analyse de variance grâce à la procédure GLM du logiciel SAS (SAS Institute, 1989). Les moyennes corrigées pour les différents facteurs ont été comparées grâce au test de Scheffé. L'influence du facteur souche sur les variables comportementales de type nominal a également été testée grâce au test du CHI^2 par la procédure FREQ du logiciel SAS.

2. Résultats

Les résultats de l'ACP pour les deux premiers axes obtenus sur l'ensemble des données sont rapportés sur la Figure 1. Ils confirment l'importance de la cinétique de chute du pH *post-mortem* sur la qualité de la viande de poulet. Le pH ultime influence fortement la luminosité (avec une corrélation moyenne sur les deux souches de –0.65 pour le filet et de –0.67 pour la cuisse), le rendement à la cuisson (corrélation de +0.51 pour le filet et de +0.61 pour la cuisse) et enfin l'exsudat de la viande fraîche mesuré uniquement sur le filet (corrélation de –0.56). Diminuer le pH ultime entraîne donc une viande plus pâle et plus exsudative présentant un rendement technologique plus faible. Le pH à 15 min au niveau du filet explique davantage les pertes en eau par exsudation (avec une corrélation moyenne sur les deux souches de –0.27) ainsi que l'indice de coloration dans le rouge (corrélation de –0.39).

L'analyse par ACP suggère par ailleurs une relation entre activité sur la chaîne d'abattage et vitesse de chute du pH dans le filet. Des coefficients de corrélation de Spearman entre durée totale de battements d'ailes et pH à 15 min estimés en moyenne intra-souche à -0.77 et -0.25 pour le filet et la cuisse respectivement, confirment cette forte relation. Au vu de ces résultats, il apparaît qu'une activité soutenue sur la chaîne d'abattage entraînerait une augmentation de la vitesse de chute du pH également associée à une augmentation de la coloration dans le rouge. Cette dernière observation pourrait s'expliquer par une augmentation de myoglobine due à un afflux sanguin plus important dans le muscle en activité déjà rapportée dans d'autres études (Khan et Nakamura, 1970 ; Ngoka et Froning, 1982 ; Ngoka *et al*., 1982).

Des différences importantes entre souches sont observées aussi bien en terme de qualité de la viande que d'activité sur la chaîne d'abattage (Figure 1, Tableau 1). Par rapport à la souche à croissance rapide, le muscle de la cuisse des animaux à croissance lente présente un rendement à la cuisson plus important (86.1 *vs* 85.1, $p<0.01$) et une couleur plus sombre (luminosité de 50.1 *vs* 51.2, $p<0.001$), associés à un pH ultime plus élevé (6.24 *vs* 6.04, $p<0.05$). Cette étude souligne par ailleurs des différences marquées entre les deux types de muscles étudiés. En effet, si le filet des animaux de la souche à croissance lente apparaît toujours plus sombre (luminosité de 50.8 *vs* 52.8, $p<0.001$), son rendement à la cuisson est significativement plus faible (82.9 *vs* 84.1, $p<0.001$) sans qu'aucune différence significative ne soit observée pour le pH ultime de ce muscle entre les deux souches (5.76 *vs* 5.76). Le filet des animaux à croissance lente présente par ailleurs des pertes en eau par exsudation plus fortes (1.03 *vs* 0.85%, $p<0.05$), résultant vraisemblablement de la vitesse de chute de pH plus rapide observée pour cette lignée (pH à 15 min de 6.31 *vs* 6.60, $p<0.001$). L'analyse des mesures comportementales sur la chaîne d'abattage souligne une activité significativement plus soutenue (Tableau 1) des animaux

à croissance lente. En effet, ces derniers essaient plus souvent de se redresser ($p<0.0001$) et battent des ailes plus souvent ($p< 0.011$) et plus longtemps ($p< 0.0001$) sur la chaîne d'abattage que les animaux de la souche à croissance rapide. Conséquence de cette forte activité, la vitesse de chute de pH est alors accélérée entraînant une augmentation de l'exsudat et de la couleur rouge du filet. Si par ailleurs, les animaux à croissance lente présentent des durées d'immobilité tonique plus courtes ($p= 0.08$), cette étude ne montre pas de relation directe entre émotivité et activité sur la chaîne d'abattage.

Enfin, au cours de cette étude, l'impact des conditions de pré-abattage a été limité au muscle de la cuisse. La chaleur provoque les effets les plus défavorables, en entraînant par rapport au groupe témoin une baisse significative du pH ultime (6.07 *vs* 6.13, $p<0.01$), une augmentation de la luminosité (51.4 *vs* 50.3, $p< 0.01$) et une diminution du rendement à la cuisson (84.7% *vs* 85.3%, $p<0.05$). Comme les travaux de Hocking *et al*. (1994), notre étude suggère donc que le développement d'une hyperthermie marquée des animaux pourrait induire une détérioration des propriétés fonctionnelles des protéines musculaires. A l'opposé, l'effet principal du transport a été d'augmenter le pH ultime de la cuisse (6.21 *vs* 6.13, $p<0.05$) et par suite le rendement à la cuisson de la viande (86.8 *vs* 85.3%, ns). L'augmentation observée du pH ultime pourrait être liée à un épuisement des animaux entraînant une diminution des réserves de glycogène musculaire avant la mort comme le suggère Lambooij (1999). Bien que les interactions ne soient pas toujours significatives, on observe toutefois un effet moins marqué du transport pour la souche à croissance lente, dont le pH ultime, la luminosité et le rendement technologique dans la cuisse semblent moins affectés que pour la souche à croissance rapide.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats confirment l'importance de la cinétique de chute du pH sur la qualité technologique de la viande de Poulet et nous confirmons, pour cette espèce, une forte relation entre pH ultime et rendement technologique. Par ailleurs, cette étude suggère que limiter l'activité des animaux sur la chaîne d'abattage contribuerait à diminuer la variabilité de la qualité de la viande. Il serait à l'avenir intéressant de confronter ces résultats expérimentaux à ceux obtenus en conditions de terrain. Notre étude souligne par ailleurs un effet important du type génétique sur plusieurs indicateurs de qualité, parfois corrélé avec des différences d'activité, et pouvant être modulé par les conditions de pré-abattage. D'autres travaux sont en cours pour mieux identifier les causes de variation, et en particulier l'importance de la composante génétique, sur les caractéristiques physico-chimiques et structurales des muscles ainsi que le niveau de stress de l'animal.

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de l'aide au développement technologique de l'OFIVAL. Nous remercions le sélectionneur Hubbard-ISA (Châteaubourg) pour sa collaboration, ainsi que N. Millet, A. Boucard, T. Bordeau, M. Couty, M. Mills et l'Unité Expérimentale de la SRA pour leur aide technique.

Références bibliographiques

Hocking, P. M., M. H. Maxwell, et M. A. Mitchell. 1994. British Poultry Science 35: 799-807.
Khan, A. W., et R. Nakamura. 1970. Journal of food science 35: 266-267.
Lambooij, E. 1999. XIV European Symposium on the Quality of Poultry Meat, September 19-23, Bologna, Italy: 311-323.
LeBihan-Duval, E., C. Berri, E. Baeza, N. Millet, et C. Beaumont. 2001. Poultry Science 80: 839-843.
LeBihan-Duval, E. *et al*. 2002. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19-23, Montpellier, France.
Magdelaine, P., et J. B. Philippot. 2000. Viandes et Produits Carnés 21(1): 31-37.
Naveau, J., P. Pommeret, et P. Lechaux. 1985. Techniporc 8 (6): 7-13.
Ngoka, D. A., et G. W. Froning. 1982. Poultry Science 61: 2291-2293.
Ngoka, D. A., G. W. Froning, S. R. Lowry, et A. S. Babji. 1982. Poultry Science 61: 1996-2003.
SAS Institute. 1989. SAS Institute Inc., Cary, NC.
Smith, D. P., et D. L. Fletcher. 1988. Poultry Science 67: 908-913.

FIGURE 1 : Analyse en Composantes Principales des variables de qualité de la viande en relation avec la souche, les conditions de pré-abattage, l'immobilité tonique et l'activité des animaux sur la chaîne d'abattage

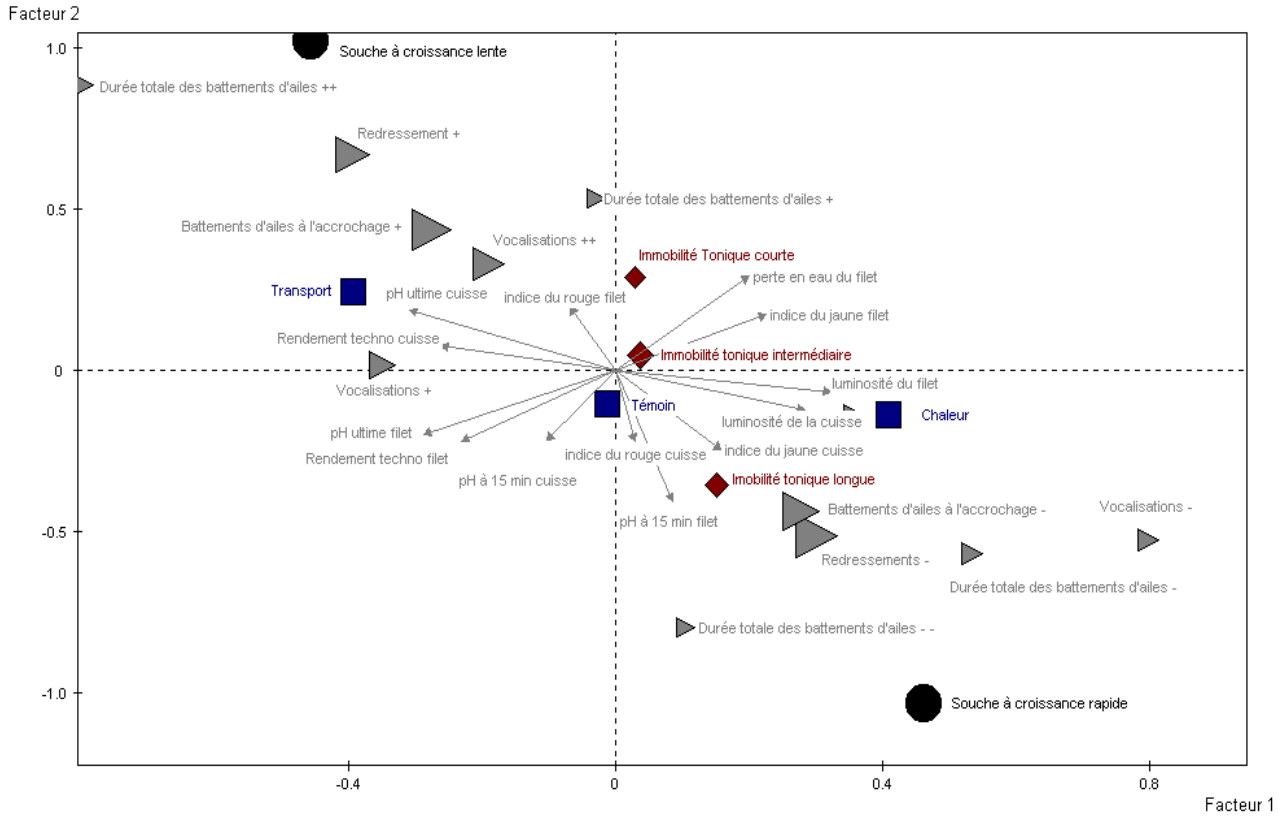


TABLEAU 1 : Répartition des animaux et probabilités des tests de Chi² sur les mesures d'immobilité et d'activité sur la chaîne d'abattage exprimées en classes, pour la souche à croissance lente (SCL) et rapide (SCR)

		immobilité tonique			battements d'ailes à l'accrochage		durée totale des battements d'ailes				redressements		vocalisations		
		0	1	2	0	1	0	1	2	3	0	1	1	2	3
SCL	effectif	32	28	20	35	55	16	11	23	32	36	54	41	11	38
	% dans la souche	40,0	35,0	25,0	38,9	61,1	19,5	13,41	28,05	39,0	40,0	60,0	45,6	12,2	42,2
SCR	effectif	21	26	34	51	37	22	33	18	8	63	25	22	32	34
	% dans la souche	25,9	32,1	42,0	58,0	42,1	27,2	40,7	22,2	9,8	71,6	28,4	25,0	36,4	38,6
proba du CHI2		0,08			0,011		<,0001				<,0001		0,06		

- **battements d'ailes à l'accrochage** : 0 : absence de battements d'ailes, 1 : présence de battements d'ailes.
- **redressement** : 0 : absence de redressement, 1: présence de redressements.
- **durée totales de battements d'ailes**: 0 : durée moyenne pour la classe de 0 s, 1 : durée moyenne pour la classe de 4 s, 2 : durée moyenne pour la classe de 12 s, 3 : durée moyenne pour la classe de 19 s.
- **immobilité tonique** : 0 : durée moyenne pour la classe de 61 s, 1 : durée moyenne pour la classe de 187 s, 2 : durée moyenne pour la classe de 504 s.
- **vocalisations** : 1 : cri court et faible, 2 : cri plus long et plus fort, 3 : cri long et fort.

VARIABILITE GENETIQUE DE LA LONGUEUR DES SERIES DE PONTE CHEZ LA POULE PONDEUSE NAINE ET PERSPECTIVES EN SELECTION AVICOLE

Tixier-Boichard Michèle[1], Chen Chih-Feng[1,2], Schobert Audrey[1], Heirman Thierry[1], Garcia Lara Teresa[3]

[1] INRA Laboratoire de Génétique Factorielle, 78352 Jouy-en-Josas,
[2] National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan , [3] Facultad Veterinaria, U.S.C. Lugo, Espagne

Résumé

La longueur des séries de ponte est une composante déterminante de l'intensité de ponte, qui a été choisie comme critère de sélection pour améliorer les performances de deux lignées de poules pondeuses naines (gène lié au sexe *DW*) Lignée L1, normalement emplumée et Lignée L2, homozygote pour la mutation *Cou nu*, *NA*. L'héritabilité de ce critère est assez élevée (0,42) mais a fortement diminué après 16 générations de sélection, ce qui suggère de rechercher un effet de gène majeur. L'intensité de ponte a été fortement améliorée par rapport à la lignée témoin LT. Les conséquences sur la qualité de l'œuf et sur le rythme de ponte sont détaillées. La sélection a diminué le poids de l'œuf et le % de coquille mais cet effet est moins marqué en L2 qu'en L1. Le contrôle de l'heure de ponte montre que l'intervalle entre ovipositions intra-série est proche de 24 h en L1 et L2, et de l'ordre de 26,5 h en LT. Dans le nycthémère 16/8 utilisé pour la sélection, la lignée L2 pond plus tôt et de manière mieux synchronisée. La combinaison des gènes *DW* et *NA* est donc favorable pour le rythme de ponte.

Introduction

L'amélioration génétique de la production d'œufs chez la poule repose généralement sur l'utilisation des critères « nombre d'œufs » ou « intensité de ponte » déterminés sur une ou plusieurs périodes, auxquels sont associés des critères de poids, de qualité de l'œuf et d'efficacité alimentaire. Parmi les alternatives à la sélection, on peut envisager d'une part l'utilisation de gènes majeurs comme le gène de nanisme lié au sexe *DW*, qui améliore l'efficacité alimentaire de la pondeuse, ou le gène *Cou nu* (*NA)*, qui améliore le poids de l'œuf, et d'autre part le choix de critères plus proches du rythme de ponte, comme la longueur des séries de ponte ou l'intervalle entre ovipositions (McClung et al., 1976 ; Yoo et al., 1984 ; Lillpers et Wilhelmson, 1993). L'intérêt de la combinaison entre les gènes *DW* et *NA* a été mis en évidence chez la poule pondeuse dès 1984 (Bordas et Mérat, 1984). Cependant, le gène *DW* a l'inconvénient de raccourcir les séries de ponte et d'allonger de 2 heures l'intervalle entre ovipositions (Yoo et al., 1984). Une expérience de sélection a donc été entreprise à l'INRA de Jouy-en-Josas en 1985, en utilisant le critère 'longueur moyenne des séries de ponte' (LSP) pour sélectionner deux lignées de poules pondeuses naines, l'une normalement emplumée, L1, et l'autre de génotype homozygote cou nu, L2, en parallèle à une lignée témoin naine, où le gène *NA* était maintenu en ségrégation. L'étude présentée ici repose sur un bilan de l'expérience de sélection, dont certains résultats sont publiés par ailleurs, et a pour but d'ajouter des informations nouvelles sur la qualité de l'œuf et sur le rythme de ponte.

1. Matériels et méthodes

1.1. Expérience de sélection

La série de ponte est définie comme le nombre d'œufs pondus de façon consécutive, l'observation d'un seul jour sans œuf est suffisant pour déterminer la fin d'une série. Pour cette expérience de sélection, les séries ont été comptabilisées depuis le 1er œuf jusqu'à l'âge moyen de 42 semaines et leur moyenne, notée LSP, a été calculée. A partir d'une même population de base, naine et hétérozygote pour le gène *NA*, deux lignées qui diffèrent par le génotype au gène *NA* (L1 et L2) ont été sélectionnées sur la LSP, avec un intervalle de génération de 1 an, pendant que la lignée témoin (LT) était reproduite sans sélection, avec le même calendrier. Le nombre de reproducteurs par lignée, initialement fixé à 11 coqs et 55 poules, a été réduit à 8-9 dans les lignées sélectionnées à partir de la génération 10. Le nombre moyen de poules mesurées par génération est compris entre 160 à 200. Les animaux jeunes sont élevés au sol, sous un éclairage de faible intensité de 10L/14N, avec un aliment démarrage suivi d'un aliment croissance. Entre 16 et 17 semaines d'âge, les poules sont mises en cage individuelle et l'éclairage était fixé à 16L/8N en une fois. Elles reçoivent un aliment 'pondeuse' contenant 15,5% de protéines brutes et 2600 Kcal/kg. La ponte est enregistrée quotidiennement, en notant le statut de l'œuf (normal, mou, cassé, double). Le poids moyen de l'œuf est mesuré à chaque génération sur 5 œufs consécutifs aux âges de 29 et 36 semaines. Les poules et les coqs sont pesés à la mise en cage et à 42 semaines d'âge. L'analyse statistique des évolutions

phénotypiques a consisté en une analyse de variance appliquée à un modèle à effets fixés, comprenant la combinaison (année x lot d'éclosion) et la combinaison (année x lignée), les contrastes entre lignées ont ainsi pu être étudiés pour chaque année.

1.2. Estimation des paramètres génétiques

L'héritabilité de la LSP et ses corrélations génétiques avec les autres caractères de ponte et de poids ont été déterminées sur 16 générations (années 1985 à 2000 inclues) en appliquant la méthodologie du REML à un modèle animal qui comprenait l'effet fixé de la combinaison (année x lot d'éclosion) et l'effet aléatoire de la valeur génétique de l'animal (Chen et Tixier-Boichard, 2003a). La variable LSP étant très dissymétrique, elle a été normalisée par une transformation Box-Cox proposée par Besbes et al. (1993). Les données de 7979 poules pondeuses issues de 518 pères et 2609 mères pour les 3 lignées ont été analysées ensemble. L'analyse a aussi été réalisée par lignée sur les données des 4 dernières générations, représentant 650 à 700 poules par lignée.

1.3. Qualité de la coquille et de l'albumen

A la génération 13, la qualité de la coquille de l'œuf a été appréciée sur 5 œufs par poule à l'âge de 29 semaines, en notant de 0 à 2 la porosité de la coquille révélée par observation à la lampe mire-œufs (0=absence de pores, 1=nombre limité de pores, 2=nombreux pores) et en notant la présence de micro-fêlures (3=peu de micro-fêlures, 4=nombreuses micro-fêlures). Un œuf cassé recevait la note de 6. Les notes ont été combinées en multipliant chaque valeur par le nombre d'œufs ayant reçu cette note, le total a été rapporté au nombre d'œufs observé pour définir un indice moyen de qualité externe. Les œufs collectés provenaient de 165 poules de la lignée LT, 192 de la lignée L1 et 188 de la lignée L2. Une deuxième collecte d'œufs à l'âge de 36 semaines a permis de déterminer la qualité de l'albumen avec les unités Haugh (Ha=100 log [épaisseur du blanc– 1,7x(poids de l'œuf)^{0,37} + 7,57]), ainsi que le poids de coquille qui a été rapporté au poids de l'œuf pour calculer le pourcentage de coquille (PcCoq). Les œufs provenaient de 150 poules de la lignée LT, 176 de la lignée L1 et 164 de la lignée L2.

1.4. Rythme de ponte

L'intervalle entre ovipositions a été calculé à l'âge moyen de 37 semaines sur toutes les poules des générations 1, 5, 10 et 16, à partir d'un contrôle horaire manuel et quotidien de 8h à 19h pendant 22 jours consécutifs,. A la génération 16, l'analyse des données de 334 poules a permis de déterminer, pour chaque lignée, l'heure moyenne de ponte, l'heure moyenne de début de série, l'heure moyenne de fin de série et le décalage d'heure de ponte entre le début et la fin de la série. Les corrélations phénotypiques ont été calculées par lignée entre les critères d'heure de ponte et les performances de ponte (Schobert, 2002). A la génération 16, 58 poules de la lignée L1 et 34 poules de la lignées L2 ont été placées dans un nycthémère 14L/10N, dans le cadre d'une autre expérience, la comparaison entre les sœurs ou demi-sœurs placées dans les 2 nycthémères 16/8 et 14/10 permet d'évaluer l'effet du nycthémère sur le rythme de ponte de ces lignées.

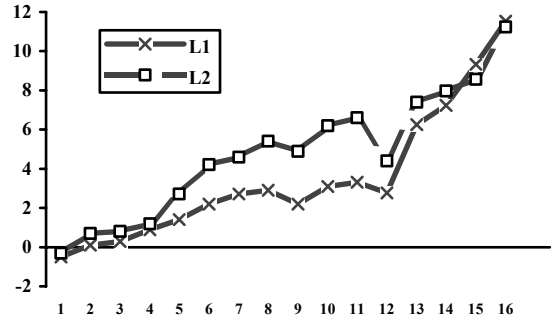
Pour les mesures de qualité de l'œuf et de rythme de ponte, l'analyse statistique a consisté en une analyse de variance appliquée à un modèle à effets fixés, comprenant l'effet du lot d'éclosion, de la lignée, du génotype au gène *NA* au sein de la lignée témoin, et, pour les lignées L1 et L2, l'interaction lignée x nycthémère.

2. Résultats

2.1. Evolutions phénotypiques de la LSP (Figure 1)

A partir de la génération 4, les lignées L1 et L2 se sont écartées significativement du témoin, dont la LSP varie peu autour de 3,5 œufs par série. La réponse à la sélection estimée par écart au témoin a été plus rapide en L2 qu'en L1 entre les générations 4 et 8, ensuite le progrès a été faible jusqu'à la génération 12, où un accident dû à une coupure d'eau a fait chuter la LSP. Ensuite, la lignée L1 a rattrapé la lignée L2 entre les générations 13 et 16. La variabilité phénotypique de la LSP a augmenté dans les lignées sélectionnées, et était constamment plus élevée dans la lignée L2. Cette augmentation était associée à l'apparition de poules aux séries extrêmement longues, jusqu'à 100, dans les lignées sélectionnées. L'intensité de ponte a augmenté de plus d'1% par génération en L1 et L2 pour atteindre 90% par rapport à une moyenne de 72% en LT.

FIGURE 1 - Evolution de la LSP en écart à la lignée témoin (mise à zéro) par génération de sélection



2.2. Paramètres génétiques

L'héritabilité de la variable LSP normalisée sur toutes les données est de 0,42±0,02, l'héritabilité estimée est un peu plus faible pour le nombre d'œufs, également normalisé, (0,40) et nettement plus faible pour l'intensité de ponte (0,28). Avant normalisation, l'héritabilité de la LSP n'est que de 0,15±0,01. L'estimation réalisée par lignée, pour la LSP normalisée sur les 4 dernières générations, donne des valeurs d'héritabilité beaucoup plus faibles pour les lignées sélectionnées (0,16 à 0,17 ± 0,04) que pour la lignée

témoin (0,51±0,05). Les corrélations génétiques n'ont été calculées que pour la variable normalisée. Sur l'ensemble des données, la LSP est moins corrélée à l'âge au 1er œuf (de -0,06 à -0,12 selon les analyses) que le nombre d'œufs (-0,60) mais la LSP est un peu plus négativement corrélée au poids d'œuf (-0,21) que le nombre d'œufs (-0,10), tout en étant très peu corrélée au poids corporel adulte avec une valeur de -0,06.

2.3. Qualité de la coquille et de l'albumen

La lignée L2 a montré un poids d'œuf généralement plus élevé de 2 g environ que la lignée L1 (Chen et Tixier-Boichard, 2003b). A la génération 13, le poids d'œuf à 36 semaines était de 49,7g en L2 et 47,1 en L1 contre 49,3g à 51,6g en fonction du génotype au locus *NA* dans la LT. On observe un moins bon aspect des coquilles dans les lignées sélectionnées par rapport au témoin, avec une valeur significativement plus élevée de l'indice de porosité et de micro-fêlures, valant 1,51 et 1,58 en L1 et L2, contre 0,99 en LT. Le PcCoq est plus faible dans les lignées sélectionnées, mais plus élevé en L2 (8,78) qu'en L1 (8,55) alors que dans la lignée LT, ce % est plus faible pour les poules non cou nu (9,10) que pour les poules cou nu (9,42). Les unités Haugh sont plus élevées pour L2 (81,7) que pour L1 (75,9) et intermédiaire en LT (76,8 à 78,2 selon le génotype pour *NA*).

2.4. Horaires de ponte

Dans les lignées sélectionnées, l'intervalle entre ovipositions se rapproche du seuil de 24 heures imposé par le nycthémère (Figure 2).

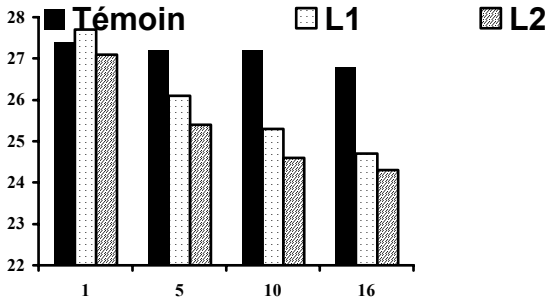


FIGURE 2 : Evolution de l'intervalle entre ovipositions entre les générations 1 et 16 pour les 3 lignées.

A la génération 16, les lignées sélectionnées pondent en moyenne vers 10h, alors que la LT pond 2 à 3h plus tard (tableaux 1, 2). La lignée témoin commence ses séries significativement plus tard que les lignées L1 et L2. La lignée L2 commence ses séries un peu plus tard et les finit significativement plus tôt que la L1, qui se décale autant que la LT, alors que la lignée L2 paraît mieux synchronisée. Dans la lignée LT, c'est l'hétérozygote pour le gène *NA* qui présente un décalage significativement plus petit. En ce qui concerne l'effet du nycthémère, on constate l'existence systématique d'une interaction entre lignée et nycthémère, sauf pour la longueur moyenne des séries. En nycthémère 16/8, la lignée L1 se décale plus que L2 et pond en moyenne plus tard avec un intervalle entre œufs supérieur, alors qu'en nycthémère 14/10 l'effet inverse est observé pour la lignée L2 (Tableau 1). Tout se passe comme si la lignée L2 était mieux adaptée au rythme 16L/8N et la lignée L1 au rythme 14L/10N.

TABLEAU 1 : Horaires de ponte, pour 2 nycthémères, dans les lignées sélectionnées.

période éclairée	6h-22h		5h – 19h	
lignée	L1	L2	L1	L2
Génotype pour *NA*	normal	cou nu	normal	cou nu
Longueur moyenne de série (pendant le contrôle horaire)	18,5	20,7	21,1	21,9
Intervalle moyen entre œufs intra-série	24,7	24,3	24,4	24,6
Heure moyenne de ponte	10,5	9,9	9,8	10
Heure moyenne de début de série	8,5	9	8,9	8,8
Heure moyenne de fin de série	13,4	11,4	12	12,6
Décalage d'heure de ponte	4,9	2,4	3,3	4

TABLEAU 2 : Horaires de ponte dans la lignée témoin

Génotype pour *NA*	normal	hétérozygote	cou nu
Longueur moyenne de série (pendant le contrôle horaire)	3,13	3,7 4,86	3,09
Intervalle moyen entre œufs intra-série	26,9	26,8 26,7	26,7
Heure moyenne de ponte	12,9	12,6 12,3	12,6
Heure moyenne de début de série	10,3	10 9,9	9,8
Heure moyenne de fin de série	15,3	15,2 14,9	15,4
Décalage d'heure de ponte	5	5,1 4,8	5,5

Les corrélations n'ont été calculées que pour le nycthémère 16L/8N. Pour certains paramètres, les corrélations sont similaires pour toutes les lignées : l'intervalle entre œufs est négativement corrélé à la longueur des séries (-.35 à -.53) et négativement corrélé à l'intensité de ponte sur tout le cycle de ponte (-.39 à -.52) ; l'heure moyenne de ponte est plus fortement corrélée à l'heure de fin de série (.62 à .71) qu'à l'heure de début de série, (.11 à .41), l'heure moyenne de ponte et l'heure de fin de série sont positivement corrélées à l'intervalle entre œufs successifs (.49 à .61) et le

décalage de l'heure de ponte est fortement corrélé à l'heure de fin de série (.72 à .85)
Des différences entre lignées sont observées pour : la corrélation entre l'heure moyenne de ponte et le décalage de l'heure de ponte, qui est faible en LT (.14) et plus forte dans les lignées sélectionnées (.32 à .64), l'heure de début de série est positivement corrélée avec l'intervalle entre œufs en LT seulement (.35), et négativement corrélée en L2 (-.31), le décalage de l'heure de ponte est très peu corrélé à l'intervalle entre œufs en LT (.18) mais beaucoup plus dans les lignées sélectionnées et encore plus en L2 (.81) qu'en L1 (.41). On voit ici que les différences opposent principalement la LT aux lignées sélectionnées, les corrélations étant affectées par le niveau de performances très différent entre lignées.

3. Discussion

L'estimation des paramètres génétiques montre que la LSP est un critère de sélection tout à fait valable, mais sa mesure suppose un enregistrement quotidien de la ponte, ce qui rend difficile son application en production commerciale. La rapide diminution de l'héritabilité de la LSP au cours de la sélection était inattendue sous l'hypothèse d'un déterminisme génétique quantitatif classique. Ce résultat peut suggérer l'existence d'un gène majeur, hypothèse qui reste à tester, et qui ouvrirait de nouvelles pistes pour le déterminisme génétique du rythme de ponte, pouvant aller jusqu'à l'identification d'un marqueur moléculaire.
La sélection pour la LSP a permis de corriger complètement le défaut dû au gène de nanisme en diminuant de 2 heures l'intervalle entre ovipositions. Lorsque cet intervalle se rapproche de 24h, la série tend vers l'infini avec un œuf par jour sans pauses, ce qui explique l'apparition d'animaux à performances très extrêmes dans les lignées L1 et L2. On constate une légère différence, significative, entre les lignées L1 et L2, à l'avantage de la lignée L2, qui présente l'intervalle le plus court de tous les génotypes comparés ici. A l'intérieur de la LT, les génotypes homozygote ou hétérozygote cou nu ont aussi un intervalle plus court que le génotype normal.
Donc, l'introduction du gène *NA* dans l'expérience de sélection a été avantageuse, car elle a permis une réponse plus rapide sur la LSP, et a produit une lignée mieux synchronisée dans le nycthémère utilisé, 16L/8N. De plus, l'effet favorable du gène *NA* sur le poids de l'œuf permet à la lignée L2 d'avoir le même poids d'œuf que la lignée témoin, avec un nombre d'œufs bien supérieur. De plus, la présence du gène Cou nu permet d'envisager une bonne adaptation à la chaleur de cette pondeuse.
Cependant, la sélection semble avoir dégradé la qualité de la coquille, un peu moins en L2 qu'en L1, mais l'évolution du pourcentage d'œufs cassés sera à surveiller. L'effet sur la coquille pourrait provenir d'un raccourcissement du temps passé par l'oeuf dans l'oviducte, cette phase est une composante importante de l'intervalle entre ovipositions et mériterait d'être mesurée dans ces lignées. De plus, l'augmentation du poids d'oeuf due au gène *NA* est associée à une diminution du % de jaune dans ces lignées (Chen et al., 2002), ce qui peut influencer la valeur technologique des oeufs, voire l'éclosabilité.
En conclusion, si l'allongement des séries, corrélé à la réduction de l'intervalle entre ovipositions, est associé à une heure moyenne de ponte plus précoce, la sélection d'animaux ayant un rythme de ponte proche de 24h, a donc pour conséquence un regroupement des horaires de ponte autour de l'heure moyenne. Cela peut constituer un atout dans la conduite de l'élevage du fait d'une moins grande dispersion de la phase horaire de ponte. Cependant, la situation peut changer si les pondeuses sont élevées en volière avec accès à un nombre limité de pondoirs, dans ce cas on préférerait éviter une trop grande synchronisation de la ponte, mais la dispersion des horaires de ponte paraît ici caractéristique des pondeuses peu performantes. Les données analysées ont révélé la présence d'animaux pondant régulièrement à 8h, 9h ou 10h mais pas à 14h ou 15h.

Références bibliographiques

Besbes B., Ducrocq V., Foulley J-L., Protais M., Tavernier A., Tixier-Boichard M., Beaumont C., 1993. Livest. Prod. Sci., 33, 313-326.
Bordas A., Mérat P., 1984. Brit. Poultry Sci., 25, 195-207.
Chen C.F., Bordas A., Tixier-Boichard M., 2002. 7ème Congrès Mondial de Génétique Appliquée aux Animaux d'Elevage, 19-23 août 2002, Montpellier, France, 32, 357-360.
Chen C.F., Tixier-Boichard M., 2003a. Genet. Sel. Evol., 35, sous presse
Chen C.F., Tixier-Boichard M., 2003b. Poultry Sci., accepté pour publication
Lillpers K., Wilhelmson M., 1993. Brit. Poultry Sci., 37, 297-308.
McClung M.R., Albert B.S., Wang B.S., Jones W.T., 1976. Poultry Sci., 55, 160-171.
Schobert A., 2002. Rapport de BTS Productions Animales, INRA - Lycée de Tours-Fondettes, 43 pages + annexes.
Yoo B.H., Sheldon B.L., Podger R.N., 1984. Brit. Poultry Sci, 25, 119-126.

PREMIERS RESULTATS DU PROGRAMME AGENAE CONCERNANT LA GENOMIQUE FONCTIONNELLE DE LA POULE

Hérault Frédéric[1], Le Meuth-Metzinger Valérie[1], Désert Colette[1], Retout Elodie[1], Piumi François[2], Govoroun Marina[3], Duclos Michel[3], Madeleine Douaire[1]

[1] INRA-ENSA, UMR de génétique animale, 35042 Rennes
[2] INRA, Centre de Ressources, LREG, 78350 Jouy en Josas
[3] INRA, Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly

Résumé

L'INRA a initié un programme de recherche génomique (AGENAE) pour 4 espèces animales, dont la poule. L'un des axes de ce programme concerne la génomique fonctionnelle, et, dans ce cadre, une banque multitissus d'ADNc (collection d'ADNc correspondant aux gènes exprimés) de l'espèce poule a été réalisée. Plus de 14000 clones ont été séquencés et sont disponibles pour des études d'expression de gènes. Les premières utilisations de ces outils, dans le cadre de recherches sur le contrôle du sexe et la maîtrise de la composition corporelle dans l'espèce poule sont présentés.

Introduction

La génétique fonctionnelle s'intéresse à l'expression des gènes, et surtout aux ARN messagers (ARNm), première étape de la cascade conduisant des gènes aux protéines puis aux caractères phénotypiques, par l'intermédiaire des différents métabolismes. Ces dernières années, il est apparu nécessaire d'accéder à des analyses systématiques de " tous " les gènes exprimés dans un type cellulaire ou un tissu donné, à un état biologique précis ; ces analyses constituent la génomique fonctionnelle. Elles ont conduit à la notion de " transcriptome " ou ensemble des ARNm exprimés par un type cellulaire ou un tissu, et par extension, dans tout l'organisme d'une espèce donnée (Velculescu et al., 1997). Cette approche est d'autant plus intéressante que les études ciblées sur des gènes identifiés participant à des métabolismes spécifiés ont montré leurs limites (Douaire et Lagarrigue, 2000).
L'objectif de telles recherches est d'identifier les gènes qui interviennent dans l'expression d'une fonction, d'un caractère et de comprendre les mécanismes de régulation mis en œuvre par l'animal dans les diverses situations physiopathologiques auxquelles il est soumis. De cette compréhension découlera de nouveaux moyens de contrôle des performances des animaux par les conditions d'élevage. Cette approche est complémentaire de la recherche des régions chromosomiques (QTL : quantitative trait loci) contrôlant la variabilité phénotypique. En effet, elle facilitera l'identification des gènes responsables de ces QTL, permettant de nouvelles actions d'amélioration génétique : de nouveaux caractères pourront être ciblés par des actions de sélection ; l'évolution de caractères déjà soumis à sélection pourra être plus finement contrôlée.
Dans ce contexte, l'INRA a initié AGENAE (pour Analyse du GEnome des Animaux d'Elevage ; http://www.toulouse.inra.fr/lgc/agena/), un programme de génomique concernant quatre espèces animales d'intérêt agronomique, dont l'espèce poule (Gallus gallus). L'un des axes de ce programme concerne la génomique fonctionnelle (Hatey et al., 2000). Deux aspects sont distingués : aspects génériques qui comprennent l'obtention d'outils d 'étude du génome exprimé et la réalisation de recherches de portée générale pour l'espèce étudiée et les espèces voisines. ; aspects finalisés, concernant des recherches destinées à apporter plus directement des réponses à des problèmes pratiques.
Nous présenterons ici les outils génériques de génomique fonctionnelle développés dans le cadre du programme AGENAE pour l'espèce poule (banque d'ADN complémentaires et séquences d' " étiquettes ") et les projets d'utilisation dans les domaines de la reproduction et de la composition corporelle dans cette espèce.

1. Collections d'ADN complémentaires

L'étude des ARNm passe par leur clonage sous forme d'ADN complémentaires (ADNc) et la constitution de banques d'ADNc, collections de clones d'ADNc représentatifs du transcriptome dans un type cellulaire, un tissu, voire un organisme entier ou plutôt un ensemble de tissus d'un organisme entier.
L'avantage de s'intéresser à l'organisme " entier " résulte d'un effet d'échelle : chez les mammifères, les estimations actuelles du nombre de gènes varient de

30 000 à 50 000, et seulement une partie (20 000 à 30 000 sont exprimés dans un type cellulaire donné (Velculescu et al., 1999). Cela signifie qu'un certain nombre de gènes est exprimé dans tous (ou presque) les tissus. Il est plus " économique " de regrouper l'ensemble des ARNm dans un même dispositif d'analyse pour éviter des répétitions inutiles d'un même travail d'identification (le séquençage de ces gènes par exemple). Dans cette optique, nous avons choisi de construire une seule banque d'ADNc à partir de plusieurs tissus (banque " multitissus "), en passant toutefois par des collections intermédiaires.

TABLEAU 1 : Banques initiales d'ADNc de Gallus gallus (programme AGENAE)

Banque	Tissus inclus dans la banque	Nombre de clones	Taille moyenne des ADNc
GCAB	Tissu adipeux	5×10^6	850 bp
	Petits follicules de poules adultes		
	Granulosa + thèques de poules adultes		
	Glandes utéro-vaginales 1&2		
	Oviducte de poule Y11		
GCAC	Petits ovaires de poules jeunes	$5{,}6 \times 10^6$	1200 bp
	Hypothalamus + hypophyse		
	Cerveau		
	Embryons de poules Y11		
	Peau du dos		
GCAD	Pancréas	$2{,}7 \times 10^6$	1200 bp
	Progéniteurs érythrocytaires aviaires normaux		
	Testicules		
	Iléon		
	Rein		
GCAE	Glandes surrénales	$2{,}7 \times 10^6$	1200 bp
	Foie		
	Jejunum		
	Caecum		
	Duodénum		
GCAF	Rate	$4{,}9 \times 10^6$	1100 bp
	Muscle		
	Bourse de Fabricius		
	Moelle osseuse		
	Thymus		

Les ARN nécessaires ont été purifiés à partir de 25 tissus prélevés sur des animaux de différents statuts (immunitaires, âges ou étapes de développement) et de différentes lignées (Y11 et PA12). Cette collecte d'ARN a été réalisée par 6 équipes de recherche (4 équipes INRA : Station de Recherche Avicole, Bioagresseurs – santé - environnement, Pathologie Infectieuse et Immunologie, Génétique factorielle, et 2 équipes CNRS : CNRS 6101 Limoges, UMR 5534 Villeurbanne).

Après analyses et purifications ultérieures, les préparations d'ARN de chaque tissu ont été regroupées en 5 lots en fonction de considérations expérimentales (efficacité de rétro-transcription) qui ont conduit à 5 banques initiales d'ADNc (tableau 1). Ces 5 banques ont ensuite été regroupées en une seule banque multitissus pour les étapes ultérieures.

Ayant regroupé dans une même collection des ADNc provenant de différents tissus, les fréquences des gènes exprimés dans plusieurs tissus ont été augmentées. De plus, au sein d'un même tissu, les différentes molécules d'ARNm ont des fréquences très différentes (on estime que l'échelle va de 1 à 10000. Une étape d'homogénéisation (" normalisation ", Soares et al., 1994) du nombre de clones représentant chaque molécule d'ARNm dans la banque multitissus est donc nécessaire. Réalisée sur la banque multitissus, cette normalisation a conduit à la banque d'ADNc normalisée GCAG. Cette banque contient 46×10^6 clones initiaux, avec des tailles d'ADNc comprises entre 0,5 kb et plus de 2 kb. 7296 clones de cette banque (choisis au hasard) ont été organisés en plaques multipuits (chaque clone est ainsi définitivement identifié par sa position dans les plaques) et sont conservés au Centre de Ressources (INRA - Jouy-en-Josas).

Afin de limiter encore la redondance résiduelle de cette banque, nous avons réalisé une " soustraction " des 7296 clones organisés de la banque entière. Cela a permis d'obtenir la banque GCAL, dont 6528 clones (choisis au hasard) ont aussi été organisés et sont conservés au centre de ressources. Cet ensemble de plus de 14 000 clones d'ADNc multitissus constitue un premier outil d'analyse du transcriptome de poulet. Ce nombre de clones sera progressivement augmenté pour tenter d'accéder à " l'ensemble " des gènes

exprimés. En pratique plusieurs limitations seront appliquées, en fonction des connaissances acquises par d'autres équipes et des moyens disponibles.
Les clones obtenus sont exploités de deux façons complémentaires et concomitantes : ils sont soumis à séquençage partiel pour identifier les gènes qu'ils représentent ; ils sont déposés sur des supports (membranes de nylon ou lames de verre) pour les analyses d'expression.

2. Séquençage et analyses des séquences

Le séquençage partiel de chacun des clones génère des " étiquettes " ou EST (pour Expressed Sequence Tag ou étiquette de séquence exprimée). Nous avons entrepris un séquençage systématique (société Millegen, Toulouse) des deux extrémités (5' et 3') des ADNc des clones organisés (14300 clones) des banques QCAG et GCAL. La taille moyenne des séquences obtenues est d'environ 460 pb.
L'ensemble de ces séquences est intégré dans la base de données SIGENA, et sera prochainement déposé dans la base de séquences publique de l'EMBL (http://www.embl-heidelberg.de/). Les analyses de ces séquences sont en cours, dans la chaîne de traitements informatiques SIGENA. Elles ont deux buts principaux :
- l'identification des gènes représentés dans la banque. En effet, les séquences EST permettent, dans de nombreux cas, d'identifier le gène correspondant, par comparaison avec les séquences connues enregistrées dans les bases de données publiques, dans l'espèce considérée, ou plus vraisemblablement lorsqu'on s'intéresse au poulet, dans une autre espèce (gène orthologue). La réalisation de ce travail en série (14300 clones) nécessite l'utilisation d'outils informatiques d'annotation, mis en place dans SIGENA.
- l'évaluation de la redondance : en effet, nous avons déjà évoqué le fait que la même molécule d'ARNm peut conduire à plusieurs clones d'ADNc. Les procédures de normalisation et de soustraction de la banque d'ADNc ont dû limiter la redondance mais n'ont pas pu l'éliminer complètement. L'analyse et le traitement des séquences permettront de définir un sous-ensemble de clones, représentants uniques de chaque molécule d'ARNm (collection unigène). De plus, ce même travail effectué sur l'ensemble des séquences des banques d'ADNc AGENAE et des séquences de l'espèce poule disponibles dans les bases de données publiques est en cours ; il permettra de comparer les différentes collections et leurs avantages respectifs, et de définir des stratégies de collaborations internationales.
Par ailleurs, ces séquences de gènes exprimés permettent (avec d'autres informations) de localiser ces gènes sur les cartes génétiques, notamment à l'aide du panel d'hybrides irradiés (Morisson et al .., 2002). Ce travail est en cours au laboratoire de Génétique Cellulaire (INRA, Toulouse). Ces informations de localisation permettent de progresser dans l'établissement de cartographies géniques comparées entre différentes espèces, et, particulièrement en ce qui concerne l'espèce poule, de bénéficier des connaissances des génomes davantage explorés comme le génome humain. Ces informations provenant d'autres génomes mieux connus sont extrêmement utiles, par exemple dans l'identification de gènes responsables de QTL (Milan et al., 2000 ; Mulsant et al., 2001).

3. Premières études fonctionnelles

3.1. Méthode

Les études de génomique fonctionnelle reposent sur les méthodologies de mesure des niveaux d'expression de " l'ensemble " des gènes d'un tissu ou d'un type cellulaire, en réponse à différentes situations biologiques, pathologiques ou non , ou pour différents génotypes. Parmi les méthodes actuellement disponibles, nous avons choisi de privilégier la technologie des " puces " à ADN :
Les ADN représentant l'ensemble des gènes du tissu ou de l'organisme étudié sont déposés sur des supports permettant l'hybridation par des sondes moléculaires. Ces sondes permettent d'identifier parmi les gènes de la collection ceux qui sont exprimés dans la situation étudiée, et leurs niveaux d'expression. Elles servent en quelque sorte de révélateurs des gènes qui sont déposés sur le support. Ces sondes sont obtenues à partir des ARNm des types cellulaires étudiés, dans les conditions biologiques étudiées.
Deux types de support sont actuellement utilisés : les membranes de nylon (ou filtres) haute densité et les lames de verre (ou puces ou micro-réseaux ou micro-arrays). Les dimensions des supports varient entre quelques cm^2 et quelques dizaines de cm^2. Les technologies développées permettent d'analyser simultanément l'expression de quelques centaines à plusieurs milliers de gènes.
Dans le cadre du programme AGENAE et des études génériques de l'espèce poule nous avons choisi de constituer des membranes (et ultérieurement des lames de verre) comportant les ADNc des clones organisés des banques multitissus. Ces supports sont confectionnés au centre de ressources (INRA, Jouy en Josas) et sont disponibles pour de nombreuses études dans l'espèce poule. En effet, puisque les gènes des nombreux tissus objet de recherche sont présents dans la banque, les ADNc déposés sur membrane ou lame de verre présentent un intérêt pour l'étude de diverses fonctions. Outre l'avantage pratique de n'avoir qu'un seul schéma de dépôts à réaliser, cela permet d'enrichir considérablement le niveau de connaissances des gènes représentés sur la membrane,

puisque leur expression sera analysée dans de très nombreuses situations. Il sera ainsi possible d'identifier précisément les relations génétiques entre plusieurs fonctions.

3.2. Analyses

L'analyse des signaux d'hybridation des ADNc portés par les membranes, dans diverses conditions expérimentales, jointe à l'identification des mêmes ADNc grâce à leurs séquences, permettra d'obtenir un profil d'expression de l'ensemble (ou une très grande partie) des gènes exprimés dans un type cellulaire, dans un état physiologique donné, pour un génotype donné et surtout de comparer les niveaux d'expression d'un grand ensemble de gènes dans différentes situations physiologiques, comme entre différents génotypes. Comme le montre les études semblables réalisées dans l'étude de cancers humains (Welsch et al., 2001, Bertucci et al., 2002), ce type d'analyse permet d'identifier des groupes de gènes importants et caractéristiques de certaines réponses de l'organisme. De telles analyses effectuées pour des fonctions contrôlant des caractères intéressants en élevage permettront d'identifier les gènes par lesquels il est possible de maîtriser l'état d'une fonction biologique et l'évolution de cette fonction en réponse à différentes conditions d'élevage. Il sera alors possible de proposer des conditions d'élevage (au sens large, incluant alimentation, environnement ...) favorables à la production envisagée.
Les informations " fonctionnelles " ainsi obtenues, jointes à la localisation des gènes considérés apporteront de nouveaux éléments pour l'identification des gènes responsables de QTL. En effet, il sera ainsi possible d'identifier des gènes importants pour une fonction déterminée et localisés dans une région du génome contenant un QTL. Cette connaissance devrait permettre d'accéder rapidement au gène responsable du QTL avec tous les avantages qui en découlent pour la sélection. Cette complémentarité d'approche est incluse dans les programmes de recherche présentés ci-après concernant la composition des carcasses.
Ces programmes utiliseront différentes générations de membranes (ultérieurement lames de verre) comportant un nombre croissant d'ADNc des banques multitissus AGENAE (de 3000 à 10000). Ils différeront par l'origine des ARN qui seront utilisés pour hybrider ces membranes, origines (animaux, conditions expérimentales) qui seront caractéristiques des fonctions étudiées : ARN de muscle ou de gonades selon que l'on s'intéresse à la croissance musculaire ou à la différenciation sexuelle, respectivement.

3.3. Programmes entrepris

Parmi les programmes de recherche utilisant ou projetant d'utiliser les méthodes de la génomique fonctionnelle dans l'espèce poule, trois ont commencé à s'appuyer sur les outils obtenus dans le cadre d'AGENAE. L'un concerne la maîtrise du sexe, les deux autres la composition des carcasses, l'un pour les muscles et l'autre, le tissu adipeux.

3.4. Contrôle du sexe

Dans les espèces avicoles, le contrôle du sexe présente un réel intérêt agronomique puisque fréquemment l'un des deux sexes seulement est utile pour une production donnée. Pour espérer maîtriser un jour le sexe dans les cohortes, il est nécessaire de bien comprendre les mécanismes de son déterminisme et leurs régulations. Dans ce but, une étude a été entreprise pour identifier les facteurs moléculaires impliqués dans la cascade de la différenciation gonadique et leurs rôles dans cette cascade, en s'intéressant à diverses étapes de la différenciation sexuelle, en situations physiologiques naturelles ou après traitement visant à inverser le sexe. En effet, il est possible d'obtenir chez la poule l'inversion sexuelle de femelles génétiques en mâles phénotypiques, en utilisant des inhibiteurs de l'aromatase, enzyme-clé de la différenciation sexuelle femelle. Ces animaux " inversés " peuvent se développer jusqu'à produire des éjaculats contenant des spermatozoïdes (Vaillant et al., communication personnelle). L'existence de spermatozoïdes W chez les animaux inversés a même été démontrée (Abinawanto et al., 1998). L'étude de la différenciation gonadique peut alors se faire en comparant la différenciation gonadique naturelle et celles induites par les inhibiteurs de l'aromatase et par les œstrogènes.
La nature des gènes exprimés et leurs niveaux d'expression vont être déterminés à l'aide des membranes (ultérieurement de lames de verre) précédemment définies. Les ARN servant à leurs hybridations proviennent de gonades embryonnaires mâles et femelles, obtenues dans les conditions naturelles ou en conditions d'inversion du sexe, à différentes étapes de la différenciation (pré-différenciation, différenciation, post-différenciation).
La caractérisation des groupes de gènes de mêmes niveaux d'expression, dans les différentes conditions d'études apportera des éléments essentiels à la compréhension de la différenciation gonadique. Il sera alors possible d'envisager le contrôle de cette différenciation en favorisant certaines voies métaboliques au détriment d'autres.

3.5. Amélioration de la qualité des viandes de volailles

Chez les volailles, la sélection d'animaux à croissance plus rapide a conduit à des animaux plus jeunes, donc moins matures à l'abattage. La viande de poulets plus âgés est jugée plus ferme et plus goûteuse (Touraille et al., 1981a,b), ce qui doit constituer l'essentiel des

différences objectives entre poulet " industriel " et poulet " label ".. Cependant, il ne semble pas que la sélection pour la croissance ou le rendement musculaire induise immanquablement une dégradation de la qualité (Duclos et al, 2000). Chez le poulet, la production d'animaux de format fixe (autour de 2 kg de poids vif) pour un coût optimal a été obtenue en augmentant la vitesse de croissance et en réduisant la durée d'élevage et l'indice de consommation. La sélection opérée a aussi modifié l'architecture musculaire. En effet, sur un modèle expérimental, constitué de deux génotypes sélectionnés de manière divergente pour une croissance rapide ou lente (Ricard, 1975), il a été montré que les fibres étaient plus nombreuses chez les animaux à plus fort potentiel (+20%) et finalement plus petites au même poids, sans modification de leur typologie (Rémignon et al., 1995).

Par ailleurs, la sélection sur un gain de poids et un rendement en filet accrus associés à une adiposité réduite (Ricard et al., 1994), a conduit à une viande de filet plus pâle, sans dégradation de son pouvoir de rétention en eau qui est même amélioré (Le Bihan-Duval et al., 1999). Pourtant, cette sélection a aussi conduit à une diminution de la vitesse et de l'amplitude de la chute de pH associée à une baisse du potentiel glycolytique (Berri et al., 2001). Dans ce contexte il nous semble important de mieux comprendre la variabilité du nombre de fibres musculaires et sa relation avec la qualité de la viande.

On sait que dès le développement embryonnaire, les étapes de mise en place des générations primaire puis secondaire de fibres musculaires vont influer sur la qualité et leur nombre ultérieur de ces fibres. Parmi les facteurs de différenciation, les facteurs de détermination myogénique (myf-5, myoD, myogénine, mrf-4) sont indispensables pour qu'une cellule s'engage et se maintienne dans la voie de différenciation myogénique. De plus on connaît certains facteurs de croissance (IGF-I et IGF-II) qui stimulent le développement musculaire, et d'autres, comme la myostatin, qui l'inhibent (voir revue par Duclos et al, 1999). Cependant, ces facteurs déjà identifiés ne sont probablement pas les seuls à expliquer l'ensemble de la variabilité du développement musculaire. C'est pour identifier les autres, leurs importances relatives et mieux comprendre l'ensemble de la mise en place des tissus musculaires que des études d'expression des gènes du développement musculaire ont été entreprises. Elles utilisent les mêmes collections de gènes et les mêmes supports que ceux précédemment décrits. La spécificité expérimentale provient de l'origine des ARN qui seront utilisés pour hybrider les membranes. Ces ARN proviennent de deux modèles génétiques complémentaires : l'un est constitué d'un génotype de poulet sélectionné à la fois pour un gain optimal de poids, une adiposité réduite et un rendement en filet accru, et de son témoin (Ricard et al, 1994). L'autre est constitué d'animaux obtenus par sélection divergente sur la vitesse de croissance (Ricard, 1975). Les ARN musculaires seront étudiés, pour les animaux de ces deux modèles, à différents stades de développement embryonnaire correspondant à la mise en place des différentes fibres musculaires, puis durant la croissance. Les analyses d'expression devraient permettre d'identifier les gènes impliqués lors des phases hyperplasique et hypertrophique du développement musculaire. De plus, on tentera d'associer les différences de qualité (couleur, amplitude et vitesse de chute de pH) à des profils d'expression génique particuliers.

3.6. Métabolisme des lipides et qualité des carcasses de poulet

Parallèlement aux évolutions observées sur le tissu musculaire, la sélection pour une forte vitesse de croissance s 'est accompagnée chez le poulet de chair d'une augmentation de l'état d'engraissement. De nombreuses recherches ont été conduites pour comprendre les mécanismes biologiques conduisant à cet excès d'engraissement afin de fournir des moyens, génétiques ou non, de le maîtriser (voir pour revue Alleman et al., 1999). Concernant les approches génétiques, elles ont été conduites dans le but d'identifier les gènes responsables de la variabilité des dépôts adipeux, afin de pouvoir fournir des moyens de sélection efficaces et ne nécessitant pas de découpe, pour maîtriser l'évolution de ce caractère. S'intéressant à l'expression des gènes, ces études ont permis de montrer l'implication prévisible de gènes codant pour des enzymes du métabolisme des lipides dans la variabilité de l'état d'engraissement (Lagarrigue et al., 2000 ; Daval et al., 2000). Cependant, des études de liaison génétique ont montré que ces gènes ne sont pas responsables de la variabilité observée, et ne peuvent donc pas être utilisés comme outils moléculaires de sélection pour maîtriser l'engraissement (Douaire et al., 2000). La démarche qui a été utilisée pour l'étude de ces quelques gènes n'est pas envisageable pour étudier un plus grand nombre de gènes, ce qui est pourtant indispensable pour arriver à identifier ceux qui contrôlent le caractère étudié. Les méthodes de la génomique fonctionnelle permettent d'aborder différemment ce problème (Carré et al., ; Assaf et al., 2003, Bourneuf et al., 2003). De façon plus systématique, les outils développés dans le cadre d'AGENAE vont permettre d'évaluer un bien plus grand nombre de gènes, connus ou non pour leur implication dans le métabolisme des lipides. Pour ce programme de recherche, les mêmes collections de gènes et les mêmes supports que ceux précédemment décrits sont utilisés, et là aussi, la spécificité expérimentale provient de l'origine des ARN qui seront utilisés pour hybrider ces membranes. Ces études utilisent deux modèles animaux différents. L'un est constitué de deux lignées de poulets de chair sélectionnées de façon divergente sur le poids de tissu

adipeux abdominal (Leclercq et al., 1980). L'autre modèle résulte de la sélection divergente sur la consommation alimentaire résiduelle de deux lignées de poules pondeuses (Bordas et al. 1992). Cette sélection, en plus de son effet sur le caractère sélectionné, a conduit à des effets corrélés sur différents caractères, dont l'engraissement corporel. Les ARN hépatiques seront étudiés, pour les animaux de ces deux modèles, dans différentes conditions nutritionnelles. Les analyses d'expression devraient permettre d'identifier les gènes impliqués dans la constitution des dépôts adipeux corporels. Les études de classification de ces gènes, en fonction de leur niveaux d'expression dans les différentes lignées, et dans les différentes conditions expérimentales, apporteront des éléments indispensables à la compréhension des mécanismes biologiques conduisant à des excès de dépôts adipeux, et à des hypothèses quant aux gènes directement responsables de la variabilité de ce caractère. De plus, ces études portant en même temps sur des animaux de chair et sur des lignées de pondeuses, permettront d'aborder l'étude de l'orientation des lipides synthétisés par l'animal dans les compartiments corporels ou dans les œufs.

Parallèlement, une recherche de QTL pour ce même caractère a été entreprise (Pitel et al., 2002, Lagarrigue et al., 2003), qui conduit à identifier plusieurs régions du génome expliquant une part importante de la variabilité du caractère. Toutefois, cette recherche de QTL, seule, ne permet pas d'identifier les gènes qui confèrent cet effet QTL. En revanche, les deux approches (QTL et génomique fonctionnelle), liées par les résultats de cartographie génique (comme nous l'avons exposé précédemment) devraient permettre d'arriver à l'identification des gènes qui contrôlent le niveau d'engraissement, gènes qui pourront devenir des outils efficaces de maîtrise génétique de ce caractère

Conclusion

Ces dernières années, la génomique fonctionnelle ou étude simultanée de l'expression d'un grand nombre de gènes (tous) d'un tissu donné s'est considérablement développée dans tous les domaines de la biologie. Au-delà d'une mode, c'est la puissance d'une telle approche pour la compréhension fine de nombreux phénomènes biologiques qui explique son essor. Les premiers résultats aboutis dans le domaine de la santé humaine en témoignent (Eisen et al., 1998 ; Welsh et al. 2001 ; Bertucci et al., 2002). Le développement de ces approches est plus récent dans le domaine agronomique et chez les animaux d'élevage. Pour ces derniers, et surtout en ce qui concerne les volailles, nous en sommes aux premières étapes indispensables, l'acquisition des outils : collections de gènes exprimés et constitution des supports d'hybridation. Nous avons présenté ici une première génération de ces outils développés par l'INRA, et les premières études entreprises qui les utilisent. Il y en a quelques autres déjà démarrées en s'appuyant sur d'autres outils (http://www.chick.umist.ac.uk/ ; http://www.chickest.udel.edu/) ou d'autres méthodologies, et beaucoup d'autres en préparation. Actuellement, cette phase d'acquisition d'outils - longue et coûteuse – n'est pas terminée. En parallèle se développent les choix des modèles et des conditions expérimentales adéquats pour la résolution des problèmes biologiques importants en élevage. L'aboutissement et la valorisation de ces travaux ne pourra se faire qu'en partenariat entre les acteurs de la recherche et des filières avicoles.

Références bibliographiques

Abinawanto , Zhang C., Saito N., Matsuda Y, Shimada K. "Identification of sperm bearing female-specific chromosome in the sex-reversed chickens", JEZ 1998, 280, 65-72.

Alleman F., Bordas A., Caffin J.-P., Daval S., Diot C., Douaire M., Fraslin J.-M., Lagarrigue S. and Leclercq B. 1999. *INRA Prod. Anim*. 12, 257-264

Assaf S. Hazard D., Hérault F., Diot C., Piumi F., Douaire M., Lagarrigue S., 2003. Journées de la recherche avicole, Tours.

Berri C., Wacrenier N., Millet N., Le Bihan-Duval E., 2001. Poult Sci. . 80(7):833-8.

Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, Eisinger F, Adelaide J, Tagett R, Loriod B, Giaconia A, Benziane A, Devilard E, Jacquemier J, Viens P, Nguyen C, Birnbaum D, Houlgatte R. 2002. Hum Mol Genet 11(8):863-72

Bordas A., Mérat P., 1981. Br. Poult. Sci., 22,25-33.

Bourneuf E., Hérault F., Retout E., Lagarrigue S., Douaire M., Diot C., 2003. Journées de la recherche avicole, Tours.

Carré W., Bourneuf E., Douaire M. and Diot C. 2002. Gene 16,235-243.

Daval S., Lagarrigue S. and Douaire M. 2000. Genet. Sel. Evol. 32, 521-531.

Douaire M., Lagarrigue S., 2000. INRA Prod. Anim., HS octobre 2000, 169-170.

Duclos M.J ., Berri C., Baeza E., Le Bihan-Duval E., Gondret F., Lefaucheur L., 2000. Viandes & Produits Carnés, hors série.

Duclos M.J., Beccavin C., Simon J., 1999. Dom. Anim. Endocrinol., 17, 231-243.

Eisen M., Spellman P., Brown P., Botstein D., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95,14863-14868.

Hatey F., Martin P., Douaire M., Le Gac F., Dambrine G., Herpin P., Monget P., 2000. INRA Prod. Anim., HS octobre 2000, 175-180.

Lagarrigue S., Daval S., Bordas A. and Douaire M. 2000. Genet. Sel. Evol. 32, 205-216.

Lagarrigue S., Pitel F., Carré W., LeRoy P., Neau A., Amigues Y., Vignal A., Cogburn L., Leclercq B., Douaire M., 2003. Journées de la recherche avicole, Tours.
Le Bihan-Duval E., Millet N. and Remignon H., 1999. Poult. Sci., 7, 822-826.
LeclercB., Blum J.-C., Boyer J.-P., 1980. Poult. Sci. 21, 107-113.
Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Iannuccelli N, Rask L, Ronne H, Lundstrom K, Reinsch N, Gellin J, Kalm E, Roy PL, Chardon P, Andersson L. Science. 2000 May 19;288(5469):1248-51.
Morisson M, Lemiere A, Bosc S, Galan M, Plisson-Petit F, Pinton P, Delcros C, Feve K, Pitel F, Fillon V, Yerle M, Vignal A. Genet Sel Evol 2002 Jul-Aug;34(4):521-33
Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen JM. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 24;98(9):5104-9.
Pitel F., Lagarrigue S., Le Roy P., Plisson-Petit F., Amigues Y., Neau A., Cahaner A., Hillel J., Sourdioux M., Leclercq B., Vignal A. and Douaire M., 2002. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montepllier, 19-23 August.
Rémignon H., Gardahaut M.F., Marché G. and Ricard F.H., 1995. J. Muscle Cell. Motil., 16, 95-102.
Ricard F.H., 1975. Genet. Select. Anim., 7, 427-443.
Ricard F.H., Marché G., Le Bihan-Duval E., 1994. INRA Prod. Anim., 7, 253-261.
Schmid M., Nanda I., Guttenbach M. et al., 2000. Cytogenet. Cell Genet., 90, 169-218.
Soares B., Bonaldo M.F., Jelen P., Su L., Lawton L., Efstratiadis A., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9228-9232.
Touraille C., Kopp J., Valin C., Ricard F.H., 1981a. Arch. Geflügelk., 45, 69-76.
Touraille C., Ricard F.H., Kopp J., Valin C., Leclercq B., 1981b. Arch. Geflügelk., 45, 97-104.
Velculescu V.E., Madden S.L, Zhang L. et al., 1999. Nature genetics, 23, 387-388.
Velculescu V.E., Zhang L., Zhou W., Vogelstein J., Basrai M. A., Bassett D.E. Jr., Hieter P., Vogelstein B., Kinzler K.W., 1997. Cell , 88, 243-251.

APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'ENGRAISSEMENT CHEZ LE POULET DE CHAIR

Bourneuf Emmanuelle, Hérault Frédéric, Retout Elodie, Lagarrigue Sandrine, Douaire Madeleine, Diot Christian

UMR INRA-ENSAR de Génétique Animale, 65 rue de St-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

Résumé

L'approche transcriptomique, c'est-à-dire l'utilisation de membranes haute densité (ou macroarrays), permet d'analyser simultanément l'expression de plusieurs centaines de gènes dans différentes conditions physiopathologiques. Des gènes sélectionnés, issus d'une analyse en Differential Display et/ou d'une banque multitissus normalisée de poulet (AGENAE) ont été déposés, sous forme de fragments d'ADNc, sur des membranes de nylon. Ces membranes ont été hybridées avec des pools d'ARN marqués, provenant de foies de poulets de lignées divergentes pour l'état d'engraissement. Les premières expériences ont révélé des problèmes de sensibilité, auxquels diverses mises au point tentent d'apporter une réponse. Quoi qu'il en soit, les gènes présentant une expression différentielle entre des poulets gras et maigres seront également analysés par d'autres techniques plus conventionnelles, afin de confirmer la puissance de la technologie de « puces à ADN ».

Introduction

L'augmentation du poids de tissu adipeux abdominal chez le poulet de chair est fortement corrélée à la sélection sur la vitesse de croissance. Cet engraissement excessif entraînant des pertes économiques à différents niveaux de la production, il est l'une des préoccupations de l'INRA. Le laboratoire de Génétique Animale a pour objectif, entre autres, de mettre en évidence des gènes impliqués dans la variabilité de l'état d'engraissement des poulets. Le modèle animal utilisé correspond à des lignées de poulets obtenues par sélection divergente sur ce caractère (lignées Grasse et Maigre, Leclercq et al., 1980). Parmi les approches mises en œuvre au laboratoire, un dispositif de Differential Display (DD; Liang et al., 1992) a permis d'isoler, à partir d'ARN hépatiques de poulets, plusieurs centaines de fragments d'ADNc, correspondant à des gènes susceptibles de présenter une différence d'expression entre les poulets gras et maigres (Carré et al., 2001). La comparaison des séquences de ces ESTs (Expressed Sequence Tags) avec les banques de données (Genbank, EMBL) a montré que ces gènes codaient des protéines impliquées dans plusieurs métabolismes, dont le métabolisme énergétique. Néanmoins, de nombreuses séquences n'ont pas pu être identifiées à ce jour.

L'un des inconvénients du Differential Display est de générer de nombreux faux positifs, c'est pourquoi une validation du différentiel est nécessaire. Les premières validations ont été effectuées par Northern-blot. Cette technique, très sensible, s'avère néanmoins fastidieuse dans le cas de plusieurs centaines de gènes à étudier. A l'inverse, la technologie des "puces à ADN" permet l'analyse simultanée des gènes isolés lors du DD.

Les fragments issus du dispositif ont donc été clonés, réamplifiés, et les amplicons correspondants déposés sur des membranes de nylon au Centre de Ressources de l'INRA de Jouy-en-Josas.

Cette approche rejoint le programme AGENAE, pour lequel le laboratoire a construit et soustrait une banque d'ADNc de poulet à partir d'ARN extraits de plusieurs tissus. Plusieurs clones de cette banque ont été ordonnés et séquencés, et ont également été déposés sur membranes.

Dans le cadre de l'étude de la variabilité de l'engraissement, les membranes ont été hybridées avec des cibles complexes correspondant à des pools d'ARN marqués, provenant de foies de poulets des lignées grasse et maigre. Une faible proportion des gènes étudiés présentait un signal facilement discernable du bruit de fond. C'est pourquoi différents tests de concentration des produits de PCR sont mis en œuvre.

Quoi qu'il en soit, cette méthode d'investigation met en évidence des gènes dont l'expression différentielle doit être confirmée par d'autres méthodes plus conventionnelles.

Ces deux approches (Differential Display et programme AGENAE) s'intègrent dans l'analyse globale du transcriptome du poulet, permettant, à terme, la mise en évidence de gènes impliqués dans la variabilité de l'état d'engraissement du poulet de chair.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Clonage des fragments différentiels, réamplification et dépôt sur membranes

Les produits issus du DD ont été clonés dans le plasmide pGem-T (pGem-T Easy Vector System, Promega) ou le plasmide pBluescript KS+ (Stratagene). La réamplification des fragments est réalisée par PCR avec les amorces universelles M13 dans un volume final de 100µl (plasmide 100ng, dNTPs 100µM, $MgCl_2$ 1.5mM, amorces 0.4mM, Tampon PCR 1X, Taq DNA Polymerase 1U ; 35 cycles d'amplification : 95°C 30'', 50°C 30'' et 72°C 1'20). Les produits d'amplification sont déposés en double et côte à côte sur membranes de nylon (8x12cm) au Centre de Ressources de l'INRA de Jouy-en-Josas.

1.2. Marquage des cibles complexes et hybridation

10µg d'ARN totaux de foie de poulets gras ou maigres sont incubés 8 min à 70°C puis 30 min de 70 à 42°C avec 8µg d'oligodT25 (qsp 13µl). La rétrotranscription se déroule pendant 2h à 42°C, en ajoutant aux ARN 1µl de RNasin, du tampon de synthèse du premier brin 1X, 2µl de DTT 0.1M, 0.6µl de dATG 20mM, 0.6µl de dCTP 120µM, 2µl de Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen), et 30µCi de (α^{32}P) dCTP à 3000Ci/mmole (qsp 30µl). La réaction est arrêtée par addition de 1µl de SDS 10%, 1µl d'EDTA 0.5M, et 3µl de NaOH 3M, durant 30min à 68°C puis 15min à température ambiante. Enfin, l'addition de 10µl de Tris 1M et de 3µl d'HCl 2N (qsp 150µl) permet d'obtenir une cible complexe prête à être purifiée. La purification se fait par chromatographie d'exclusion stérique (Chromaspin-100, Clontech), puis la cible est dénaturée 5 minutes à 100°C avec 2 µg d'oligonucléotide A80 (Life technologies). Enfin, on ajoute à cette solution 1 ml de tampon d'hybridation (5X SSC, 5X Denhardt's, 0.1% SDS) pour une incubation de 2h30 à 65°C.
Les membranes sont préalablement incubées dans 10ml de tampon d'hybridation, pendant 5h à 42°C. Une fois la cible complexe ajoutée dans le tampon, l'hybridation se déroule à 65°C pendant 48h. Après 3 lavages successifs dans une solution de 0.1X SSC, 0.1% SDS, les membranes sont exposées contre un écran photostimulable, qui est ensuite scanné à l'aide d'un imager Storm (Molecular Dynamics).

1.3 Analyse

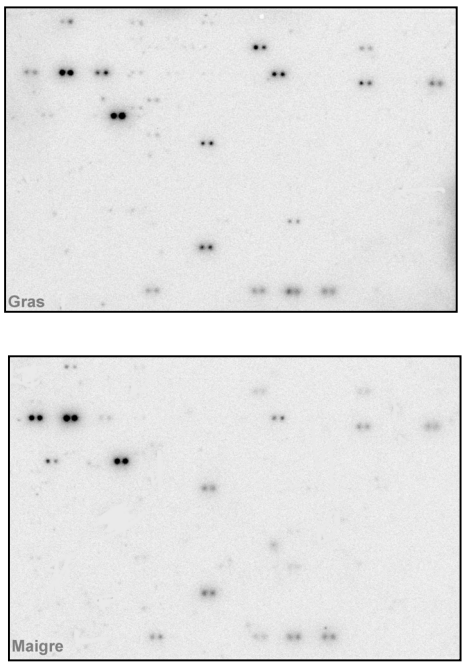
Une analyse plus poussée intervient ensuite à l'aide de logiciels spécialisés (Cluster, Treeview, Jexpress...). Ce type de logiciel permet de comparer l'expression des gènes entre deux situations (poulets gras vs. poulets maigres), et d'aboutir à des « signatures moléculaires » d'un état physiologique. En effet, il est possible de réunir plusieurs gènes présentant un profil d'expression similaire en fonction des différentes conditions. Le profil d'expression de ce groupe de gènes est alors considéré comme représentatif d'un phénotype, et par conséquent peut en constituer un « marqueur ». Il est néanmoins important de préciser que ces gènes ne sont pas systématiquement responsables de la variabilité du caractère étudié, mais que leur expression différentielle peut en être une conséquence directe.

2. Résultats et Discussion

Parmi plusieurs centaines de fragments issus du dispositif de Differential Display, 201 ont pu être clonés. Tous ces produits ont été réamplifiés par PCR, à partir des amorces universelles M13. Les amplicons obtenus ont une taille comprise entre 400 et 1000pb, et la plupart correspondent aux extrémités 3' des gènes. En effet, les oligonucléotides utilisés lors de l'étape de rétrotranscription du DD étaient des amorces antisens oligodT ancrées en G,C ou A et correspondant donc à l'extrémité 3' polyA+ des ARNm (Liang et al.,1994).

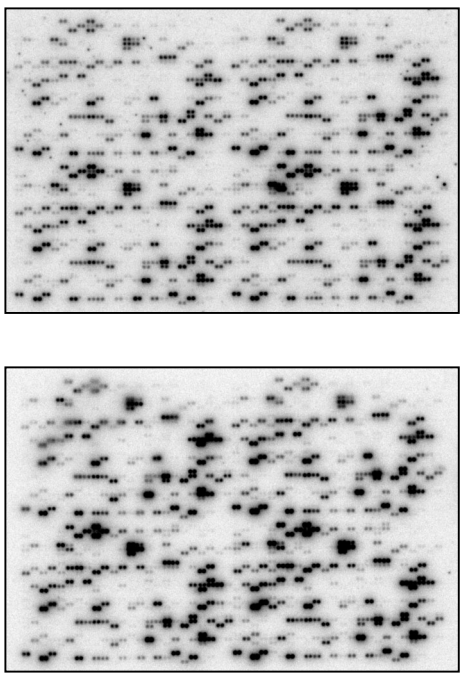
Les premières expériences ont été réalisées sur les membranes contenant ces produits (membranes « Differential Display »), et sur des membranes contenant 4 répétitions de 384 clones de la banque AGENAE. Pour chaque lot de membranes, deux hybridations ont été effectuées : l'une avec une cible complexe synthétisée à partir d'un pool d'ARN hépatique de poulets gras, et l'autre avec une cible complexe correspondant aux ARN de foie de poulets maigres (Figure 1).

FIGURE 1 : Hybridation des membranes "Differential Display", avec des cibles complexes issues d'ARN de foies de poulets gras (a) ou maigres (b)



Dans le cas des membranes DD, seule une vingtaine de doublets présente un signal exploitable. En ce qui concerne les membranes AGENAE (Figure 2), 20 à 30% des doublets sont visibles. La proportion plus importante de signaux visibles sur les membranes AGENAE peut s'expliquer par le fait que les clones déposés appartenaient à la banque multitissus non soustraite. La redondance de certains gènes n'est donc pas négligeable, expliquant tout à fait cette proportion élevée par rapport aux membranes DD. Néanmoins, au vu de ces résultats d'hybridation, une question de trop faible sensibilité est soulevée, à laquelle des expériences complémentaires peuvent répondre. Des essais de synthèse et de marquage des cibles complexes en amorçage aléatoire (plutôt qu'avec des amorces oligod(T)) ont notamment été effectués, sans apporter d'amélioration notable aux signaux observés. D'autres modifications par rapport au protocole d'origine ont été envisagées. Des essais de concentration des produits de PCR à déposer (concentration par 4) et/ou de purification (par chromatographie ou par précipitation) sont en cours, afin de pouvoir observer des signaux qu'il était impossible de distinguer du bruit de fond auparavant.

FIGURE 2: Hybridation des membranes AGENAE, avec des cibles complexes issues d'ARN de foies de poulets gras (a) ou maigres (b).



D'autre part, l'analyse quantitative des résultats de puces à ADN ne peut se faire qu'en normalisant les signaux entre différentes hybridations au sein d'une même expérience. Une des méthodes utilisées est d'intégrer des spikes : il s'agit d'ADN/ARN exogènes, le plus souvent provenant d'organismes végétaux, codant pour des protéines inexistantes dans l'espèce étudiée. L'ADN (sous forme de produit de PCR) est déposé sur les membranes conjointement aux amplicons dont on veut analyser l'expression. Les ARN correspondants sont inclus, en quantité constante, au pool d'ARN de départ. L'hybridation des ARN exogènes avec les produits de PCR complémentaires constitue à la fois un contrôle positif de l'hybridation, mais aussi un contrôle de l'efficacité de marquage. Ainsi, la normalisation des signaux observés sur les membranes, par rapport à ceux des spikes, permet d'obtenir des résultats réellement comparables. Des spikes provenant d'A. thaliana seront utilisés lors des tests de concentration et de purification des produits PCR.

Cette étude est pour l'instant limitée à l'expression des gènes dans le foie des poulets des lignées grasse et maigre, mais peut être facilement étendue à d'autres types d'animaux, de cellules... Par exemple, les lignées de poulets R+/R- ont été sélectionnées sur la consommation alimentaire résiduelle (Bordas et al., 1992). Il a été montré que ces poulets R+/R- présentaient des phénotypes respectifs de type maigre et gras (El-Kazzi et al., 1995). Il serait donc intéressant de déterminer, par cette méthode de puces à ADN, si les gènes intervenant dans cette variabilité du caractère sont identiques à ceux qui sont impliqués dans le cadre des poulets gras et maigres. A ce titre, des ARN hépatiques de nombreux animaux R+/R- ont été extraits.

La lignée cellulaire LMH (Leghorn Male Hepatoma), constitue également un bon modèle pour l'analyse de l'expression des gènes du métabolisme énergétique. Des substances comme l'insuline ou les acides gras polyinsaturés ont un effet notable sur de nombreux gènes connus du métabolisme hépatique des lipides. Les ARN des cellules LMH traitées avec de tels produits ont également été extraits et seront utilisés comme cibles complexes à hybrider avec les membranes, afin de déterminer quelle influence ils exercent sur l'expression des gènes issus du dispositif de DD.

Il est alors possible d'établir des profils d'expression similaires pour des groupes de gènes, et de les assigner à des états physiopathologiques donnés. Ces gènes pourront alors être utilisés comme « marqueurs moléculaires » des états gras ou maigres. De plus, l'intégration d'un gène inconnu dans un groupe de même profil d'expression peut donner des indications quant à sa fonction potentielle, ou son implication dans une voie de transduction cellulaire par exemple.

Suite à l'utilisation de cette technologie, il est nécessaire de valider les résultats par une méthode plus conventionnelle et éprouvée. C'est pourquoi la majorité des gènes mis en évidence par le DD entrent dans un programme d'analyse d'expression par RT-PCR semi-quantitative (par chimie SYBR Green), en collaboration avec l'UMR Veau Porc de l'INRA de St-Gilles. Cette méthode devrait donc confirmer les résultats obtenus par l'hybridation de puces à ADN, à savoir un différentiel d'expression de gènes entre les poulets gras et maigres.

Enfin, l'intégration des approches transcriptomiques et d'une approche de recherche de QTL (programme de détection de Locus impliqués dans le caractère) d'engraissement dans le dispositif gras/maigre peut aboutir à la mise en évidence de gènes candidats impliqués directement dans la variabilité de l'état d'engraissement chez le poulet de chair.

Références bibliographiques

Bordas A, Tixier-Boichard M, Merat P, 1992. Br. Poult. Sci. 33(4), 741-54.

Carré W, Diot C, Fillon V, Crooijmans RP, Lagarrigue S , Morrisson M, Vignal A, Groenen MA, Douaire M, 2001. Anim. Genet., 32(5), 289-97.

El-Kazzi M, Bordas A, Gandemer G, Minvielle F, 1995. Br. Poult. Sci. 36, 719-728.

Leclercq B, Blum JC, Boyer JP, 1980. Poult. Sci. 21, 107-113.

Liang P, Pardee AB, 1992. Science, 257, 967-971.

Liang P, Zhu W, Zhang X, Guo Z, O'Connell RP, Averboukh L, Wang F, Pardee AB, 1994. Nucleic Acids Res, 22, 5763-5764.

IDENTIFICATION DE QTL POUR L'ETAT D'ENGRAISSEMENT ET LE POIDS DE FILET CHEZ LE POULET DE CHAIR

Lagarrigue Sandrine[1], Pitel Frédérique[2], Carré Wilfrid[3], Le Roy Pascale[4], Neau André[5], Amigues Yves[6], Vignal Alain[2], Simon Jean[7], Cogburn Larry[3], Leclercq Bernard[7], Douaire Madeleine[1]

[1]UMR INRA-ENSAR, Génétique animale, 35042 RENNES, [2]INRA-Laboratoire de Génétique cellulaire, 31326 AUZEVILLE, [3]Department of Animal and Food Sciences Université de Delaware Newark Delaware, 19717 1303 USA, [4]SGQA INRA, 78352 JOUY EN JOSAS, [5]DGA INRA, 78352 JOUY EN JOSAS, [6]Labogena Domaine de Vilvert, 78352 JOUY EN JOSAS, [7]INRA-Station de Recherches Avicoles, 37380 NOUZILLY.

Résumé

Dans le but d'identifier des QTL pour l'état d'engraissement et le poids de filet des poulets de chair, un dispositif familial F0-F1-F2 a été réalisé par croisement de lignées divergentes sélectionnées sur le poids de tissu adipeux abdominal. 585 descendants mâles F2 nés en 4 lots d'éclosion étaient issus de 5 familles de pères F1 accouplés à 7 à 8 femelles F1. Ces individus F2 ont été mesurés pour différents caractères dont le poids de tissu adipeux abdominal et le poids de filet après abattage à 8 semaines. 258 marqueurs de type microsatellites ont été testés pour leur informativité sur les mâles F1. En final 130 marqueurs bien répartis sur le génome et hétérozygotes pour la majorité des pères F1 ont été retenus pour génotyper 309 poulets F2 correspondant aux 40 individus extrêmes (20 individus de chaque extrême) pour chacun des 2 caractères d'intérêt, et ce dans chacune des 5 familles.
L'analyse QTL multipoint, effectuée à partir de l'ensemble de ces génotypes et des mesures phénotypiques corrigées pour le lot d'éclosion, la mère et le poids vif à 8 semaines, a permis de mettre en évidence différentes régions QTL dont les plus significatives (P<5%) se trouvent sur le chromosome 5 pour le poids de tissu adipeux abdominal corrigé pour le poids vif et sur le chromosome 1 pour le poids de filet.

Introduction

Dans la production de poulet de chair, l'état d'engraissement est l'un des caractères secondaires pour lesquels l'information moléculaire pourrait fournir des outils intéressants dans les programmes de sélection. Dans le but d'identifier des QTL (Quantitative Trait Loci) intervenant dans la variabilité de ce caractère chez le poulet de chair, deux lignées, grasse et maigre, sélectionnées de manière divergente sur le poids de tissu adipeux abdominal (Leclercq et al., 1980) ont été croisées, pour générer un dispositif F0-F1-F2. Une recherche de QTL a été effectuée sur ce dispositif par un criblage du génome à l'aide de marqueurs microsatellites : la carte génétique de la poule, élaborée grâce à une collaboration internationale (Groenen et al., 2000), permet en effet de disposer de près de 1000 marqueurs microsatellites, couvrant la quasi-totalité du génome aviaire.

L'objectif de cette étude était de déterminer les régions du génome comportant des QTL intervenant dans le poids de tissu adipeux et le poids de filet après abattage à 8 semaines, en ségrégation dans la population étudiée.

1. Matériels et méthodes

1.1. Animaux

Les grands-parents F0 sont issus de deux lignées divergentes sélectionnées par Leclercq et al. (1980) pour un poids de tissu adipeux abdominal faible (lignée Maigre) ou fort (lignée Grasse). Neuf mâles de la lignée Grasse ont été croisés avec 12 femelles de la lignée maigre pour engendrer la génération F1. Cinq mâles F1 ont été croisés avec 7 ou 8 femelles F1 chacun (38 au total) pour produire les 5 familles de pères de la génération F2 en 4 lots d'éclosion. La taille du dispositif et la divergence importante des lignées Grasse et Maigre pour le caractère d'engraissement doivent permettre de détecter avec une probabilité de 0,9 des QTL dont l'effet atteint environ 0,7 écart-type phénotypique (Lander et Botstein, 1989).
Les descendants F2 ont été abattus à 8 semaines, et l'état d'engraissement a été estimé par le poids de tissu adipeux abdominal. Le poids de filet à l'abattage a également été mesuré pour chaque individu. Dans chacune des 5 familles, ont été sélectionnés pour le génotypage les 40 individus les plus extrêmes (20 pour chaque extrême) de chaque distribution des 2 caractères d'intérêt précorrigés comme indiqué ci-dessous.

Les performances ont été corrigées pour les effets mère et lot d'éclosion par une analyse de variance à 2

facteurs, dans laquelle le poids vif à 8 semaines a été introduit comme covariable (procédure GLM de l'ensemble de logiciels statistiques SAS, 1989).

1.2. Marqueurs et génotypage

L'ADN a été extrait à partir de 100 µl de sang de chaque animal, selon la méthode classique d'extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol avec quelques modifications afin de l'adapter à une grande série d'échantillons.
258 marqueurs de type microsatellite ont été testés pour leur informativité sur les 5 mâles F1. 130 marqueurs bien répartis sur le génome (Tableau 1) et hétérozygotes pour la majorité des pères F1 ont été retenus pour le génotypage des animaux du dispositif.

TABLEAU 1 : Nombre de marqueurs de type microsatellites par chromosomes ou groupes de liaison, utilisés pour le criblage complet du génome du croisement F0-F1-F2 lignées Grasse et Maigre

Les chromosomes 12, 16, 17, 23 et 24 ainsi que 4 groupes de liaison ont été analysés au travers d'un seul marqueur et ne font pas l'objet de la présente étude ; de même pour 3 marqueurs isolés.

chromosome	Nombre de marqueurs utilisés	Distance couverte en Morgan (M)
1	17	5,23
2	17	4,36
3	13	3,25
4	7	2,94
5	11	1,55
6	3	0,68
7	7	1,34
8	5	0,97
9	4	0,60
10	3	0,46
11	2	0,39
13	4	0,34
14	4	0,79
15	2	0,27
18	2	0,14
19	2	0,28
20	4	0,12
26	3	0,47
27	2	0,34
28	2	0,43
z	4	1,01

Les amplifications PCR ont été effectuées dans 15 µl de mélange contenant 25 ng d'ADN génomique, 0,2 µM de chaque amorce, 0,5 U de Taq polymerase, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl2, 0,2 mM de dNTP. Après un cycle de dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, 30 cycles d'amplification ont été effectués (dénaturation : 94°C, 30 s ; hybridation : 55°C ou 58°C en fonction des marqueurs, 30 s ; élongation : 72°C, 30 s).

Les échantillons ont été analysés sur un séquenceur ABI 3100 (Perkin-Elmer) à l'aide des logiciels GeneScan 3.7 et Genotyper 3.6 (PE Biosystems).

1.2. Analyse statistique

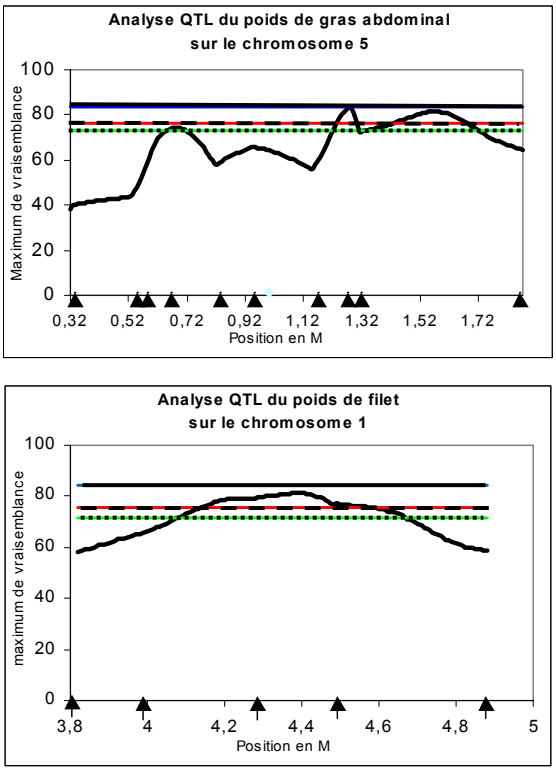
Pour les groupes de liaison comprenant plusieurs marqueurs, la détection de QTL a été effectuée par une analyse multipoint réalisée avec le programme QTLmap (Le Roy et al., 1998), modifié pour permettre l'analyse d'une population complexe (mélange de familles pleins frères et demi-frères). La significativité des régions mises en évidence a été testée par 1000 simulations successives.
Pour les marqueurs non liés, une analyse de variance (procédure GLM de SAS) a été effectuée (résultats non présentés ici).

2. Résultats et discussion

Une moyenne de 58% des marqueurs par père ont révélé du polymorphisme. Ce niveau d'informativité est relativement élevé, sachant que l'étude porte sur des lignées divergentes provenant d'une même origine ; on peut l'expliquer par la grande variabilité existant au sein de la population dont elles sont issues (6 lignées de poulet de chair différentes).
L'analyse des données issues de 309 animaux F0, F1 et F2 a permis de mettre en évidence 7 régions QTL qui sont susceptibles d'intervenir dans la variabilité du poids de tissu adipeux abdominal ajusté pour le poids corporel. Les régions QTL ayant le seuil de signification le plus élevé ($P < 5\%$) se trouvent sur le chromosome 5 autour des positions 1,35M et 1,64M (Figure 1). Compte tenu de la distance entre les marqueurs utilisés dans ces régions, il est possible que ces 2 régions QTL n'en représentent en fait qu'une. Une autre région QTL autour de la position 0,60M est également observée sur ce chromosome mais avec un seuil de signification moindre. Quatre autres régions porteuses d'un QTL en ségrégation dans notre population sont également soupçonnées sur les chromosomes 1, 3, 7 et 13 respectivement aux positions 4,49M, 0,84M, 0,32M et 0,22M.
L'existence d'un QTL pour le poids de filet à 8 semaines est également observée ($P<5\%$) sur le chromosome 1 à la position 4,39M (Figure 1).
Des analyses complémentaires sont en cours pour étudier la nature additive ou dominante des effets de ces différents QTL . Par ailleurs, ce projet se poursuit par l'étude de la ou des région(s) QTL pour le poids de gras abdominal mise(s) en évidence sur le chromosome 5, et ce grâce à la mise en place de croisements de type Backcross.

FIGURE 1 : QTL observés pour le poids de gras abdominal et le poids de filet respectivement sur les chromosomes 5 et 1

Courbe : résultats du test statistique de l'analyse QTL multipoint. Seuils de signification : P =10% (ligne en pointillé), P=5% (ligne discontinue), P=1% (ligne pleine). Les flèches indiquent la position des marqueurs utilisés.



Références bibliographiques

Groenen M. A. M., Cheng H. H., Bumstead N., Benkel B. F., Briles W. E., Burke T., Burt D. W., Crittenden L.B., Dodgson J., Hillel J., Lamont S., Ponce de Leon F.A., Soller M., Takahashi H., and Vignal A., 2000. A consensus linkage map of the chicken genome. Genome Res. 10:137-147.

Lander E.S. and Botstein D, 1989. Genetics 121 :185-199.

Le Roy P., Elsen J.M., Boichard D., Mangin B., Bidanel J.P., and Goffinet B., 1998. Proc. 6th WCGALP, 26 : 257-260.

Leclercq B., Blum J.C., Boyer J.P., 1980. Poult. Sci. 21, 107-113.

SAS Institute. SAS/STAT® User's Guide, Version 6. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989.

ELABORATION D'UNE PUCE A ADN EN VUE D'ETUDIER LA REGULATION DU METABOLISME HEPATIQUE DES LIPIDES CHEZ LE POULET

Assaf Sirine, Hazard Dominique, Hérault Frédéric, Diot Christian, Piumi François, Douaire Madeleine et Lagarrigue Sandrine

UMR de Génétique Animale, INRA/ENSAR, 65 Rue de Saint Brieuc 35042 Rennes

Résumé

Afin de mieux comprendre les réseaux de régulation des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides chez le poulet, nous avons entrepris la réalisation d'une puce dédiée. Le foie étant le lieu principal de la lipogénèse chez les oiseaux, 220 gènes à expression hépatique, intervenant dans ce métabolisme, et ce toutes espèces confondues, ont été répertoriés d'après les données bibliographiques. Afin d'isoler ces gènes chez le poulet, deux stratégies ont été mises en place, utilisant d'une part des séquences homologues (dont des EST) et des séquences hétérologues d'autre part. Au total, 124 gènes aviaires ont été amplifiés par PCR et clonés sous forme de fragments de 300 bases localisés dans les régions codantes. Les produits PCR et des ADNc contrôles (spikes), permettant de normaliser les hybridations, ont ensuite été déposés sur membranes pour être hybridés. Les premiers résultats obtenus montrent des problèmes de sensibilité nous conduisant encore à quelques mises au point. Une fois ces dernières achevées, cet outil pourra être utilisé dans différents dispositifs d'animaux (caractérisés par des génotypes, des états nutritionnels ou des états physiologiques différents) afin de mieux étudier la régulation de ce métabolisme chez les espèces aviaires et de mieux appréhender son implication dans les variations phénotypiques observées.

Introduction

Le métabolisme des lipides dont le fonctionnement et la régulation sont extrêmement complexes, peut être une des causes de la variabilité de l'état d'engraissement chez le poulet, caractère non valorisable que la filière « poulet de chair » cherche à maîtriser.

Ce métabolisme et sa régulation sont beaucoup mieux connu chez les mammifères (en particulier l'homme et la souris) que chez le poulet. Afin de contribuer à une meilleure connaissance de ce métabolisme chez les oiseaux, nous avons opté pour une approche transcriptomique, nécessitant d'élaborer une puce (ou macroarray) appropriée, sur laquelle sont déposés des ADNc correspondant à différents gènes du métabolisme des lipides, et permettant ainsi d'analyser simultanément l'expression de l'ensemble de ces gènes dans différentes conditions génétiques ou physiopathologiques.

Afin de prendre en compte la complexité de ce métabolisme, nous avons pris en considération les gènes d'expression hépatique impliqués dans différents sous-métabolismes associés :

- la synthèse et dégradation des acides gras (lipogénèse, désaturation, formation des triacylglycérols, lipolyse, ß-oxydation, transport et stockage),
- la synthèse et la dégradation du cholestérol,
- la synthèse des phospholipides,
- les métabolismes fournissant l'acetyl coenzyme-A (glycolyse, cycle des pentoses phosphates), cette molécule étant le substrat de tous les lipides synthétisés *de novo,*
- les métabolismes utilisant l'acetyl-coenzymeA (néoglucogénèse, cycle de Krebs, formation des corps cétoniques),
- les gènes impliqués dans la transduction des signaux d'hormones connus pour réguler l'engraissement (insuline, glucagon, T3 ou oestrogènes),
- les différents facteurs de transcription actuellement connus pour réguler l'ensemble de ces gènes.

Ainsi, cette étude se veut globale puisqu'elle englobe un large éventail de gènes impliqués dans le métabolisme hépatique des lipides mais également dans les métabolismes hépatiques associés.

Une étude bibliographique , toutes espèces confondues, nous a permis de répertorier au final 220 gènes. Parmi ces 220 gènes d'intérêt, 160 ont fait l'objet d'une tentative de clonage chez le poulet en utilisant différentes stratégies que nous présenterons ici. Pour chacun de ces gènes, notre objectif était d'isoler et de cloner un fragment localisé dans la région codante, région connue pour être assez conservée entre espèces. En effet, cette puce a pour objectif non seulement de mener des études sur le métabolisme hépatique des lipides chez le poulet mais aussi sur d'autres espèces de volaille comme le canard et l'oie (étude de la stéatose hépatique). Nous souhaitions également, dans la mesure du possible, que les fragments clonés comportent la région 3' UTR (UnTranslated Region), devant ainsi faciliter la qualité des hybridations effectuées avec des cibles

complexes générées par transcription inverse depuis leur partie 3' terminale grâce à une amorce oligo-d(T). Au final, 124 gènes aviaires ont été isolés et clonés sous forme de fragments d'environ 300 bases localisés uniquement dans la région codante des gènes.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Isolement et Clonage des 124 gènes chez le poulet

Transcription inverse : 1 à 2,5µg d'ARN totaux, issus de foies de poulets commerciaux sous différents statuts nutritionnels (a jeun et nourri), ont été transformés en ADNc par transcription inverse à partir d'amorces oligo-d(T) ancrées sur 2 bases, avec la SuperscriptII (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur.

Choix des amorces : Les amorces ont été choisies en respectant les paramètres suivant : la Tm (température de fusion) des deux amorces, la taille du fragment à amplifier, l'absence de complémentarité inter et intra amorces. Elles ont été déterminées, d'une part dans la région codante du gène qui est connue pour être mieux conservée entre espèces que les régions non codantes, d'autre part de façon à générer des fragments de même taille (~300pb) afin de standardiser la production des produits PCR.
- ***Amorces hétérologues*** : Les amorces ont été choisies manuellement dans les zones les plus conservées. Les séquences utilisées pouvaient être de nature nucléotidiques ou protéiques. Dans ce dernier cas, les amorces correspondaient à une combinaison de séquences, déterminée d'après la dégénérescence du code génétique.
- ***Amorces homologues*** : Elles ont été dessinées grâce au logiciel « Primer 3 » (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_cgi) à partir de séquences poulet bien caractérisées ou de sequences de type EST (Expressed Sequence Tag).
Par ailleurs, nous avons listé, dans PubCrawler (http://www.pubcrawler.ie), les gènes n'ayant pas été amplifiés par la stratégie hétérologue et pour lesquelles nous ne disposions pas encore de séquences homologues. Ce logiciel permet d'effectuer, pour ces gènes, une recherche automatique, hebdomadaire, de nouvelles séquences.

PCR : Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été effectuées dans 100µl final, à partir de 5ng de plasmides d'une banque de foie de poulet développée au laboratoire ou de 2µl d'ADNc (cf. paragraphe transcription inverse). Le mélange réactionnel constitué de 1,5 mM $MgCl_2$, de tampon Taq 1X (Tris-HCl 20 mM ; KCl 50 mM), de 0,2 µM d'amorces sens et anti-sens (Eurogentec), de 100 µM de chacun des dNTPs et de 5U de Taq polymérase (Invitrogen) est ajouté au matériel à amplifier. L'amplification PCR est constituée de 35 cycles, chacun comprenant 3 étapes : dénaturation à 95°C, 30s ; hybridation des amorces à la température Tm (généralement 60°C), 30s ; élongation à 72°C, 30s.

Clonage : Les produits PCR présentant une bande unique et à la taille attendue, ont été insérés dans un plasmide grâce au kit « TA cloning » (Invitrogen). Des bactéries thermo-compétentes ont été ensuite transformées avec ces plasmides. Un criblage sur milieu solide a permis alors d'isoler les colonies ayant reçu un plasmide contenant un insert. Les plasmides ont été extraits avec le kit Nucleospin (MashreyNagel). La taille des inserts a été contrôlée par PCR réalisée avec les amorces universelles M13 sens et anti-sens. Les inserts de taille attendue ont été alors séquencés. Les colonies bactériennes ont été stockées dans 15% de glycérol à -80°C.

1.2. Amplifications et dépôts des produits PCR sur membrane

Amplifications des produits PCR : Les fragments d'ADNc clonés ont été amplifiés par PCR à partir de 5ng de plasmide avec les amorces universelles M13 spécifiques du vecteur et à une température d'hybridation de 50°C.

Concentration des produits PCR : Le volume réactionnel d'une première PCR a été évaporé dans un thermocycleur, à 95°C, puis les volumes réactionnels des autres PCR ont été ajoutés successivement, à mesure de l'évaporation.

Dépôts sur membrane : Les dépôts sur membranes ont été effectués au centre de ressource INRA de Jouy en Josas. 24 membranes ont été imprimées en conditions standards (ADN issus d'une PCR de 100µl et dépôt par 5 allers-retours du "spoteur") et 16 membranes l'ont été en conditions particulières utilisant des produits PCR de concentrations différentes et par 5 ou 20 allers-retours du "spoteur".

1.3. Marquage des cibles complexes (ARN) et hybridation

5 à 10µg d'ARN totaux ont été marqués avec 50µCi d'α^{32}P dCTP, par transcription inverse à partir d'amorces oligo-d(T) (comme décrit dans la communication Bourneuf et al).
Les membranes ont été préalablement incubées dans 10 ml de tampon d'hybridation pendant 5h à 42°C puis ont été hybridées avec les cibles complexes (ARN marqués) à 65°C pendant 48h.
Les membranes ont été alors rincées dans une solution de SSC 0,1X, SDS 0,1%, puis lavées dans cette même solution 3 fois 1h. Les membranes ont été ensuite exposées contre un écran photostimulable (Molecular Dynamics) pendant 1 à 5 jours, écran qui est ensuite lu par un lecteur Storm (Molecular Dynamics).

2. Résultats et Discussion

Afin de cloner des fragments comportant à la fois une partie de la région codante et la région 3' UTR, une première stratégie mise en place sur un petit nombre de gènes a consisté à rétro-transcrire des ARN totaux avec une amorce oligo-d(T) puis à les amplifier par PCR avec la même amorce oligo-d(T) couplée avec une amorce sens située dans la région codante spécifique du gène d'intérêt (la plus en 3' possible). De tels essais d'amplification effectués sur 4 gènes différents, n'ont pas permis de mettre en évidence un fragment d'ADNc unique. Afin de gagner en spécificité d'amplification, des PCR ont alors été effectuées avec une amorce sens nichée par rapport à la première et l'amorce oligo-d(T), et ce sur les produits PCR précédents. Les résultats n'ont pas été plus concluants, aucun fragment unique n'étant généré. Ces différents échecs nous ont finalement amenés à abandonner cette démarche et nous ont conduits à n'amplifier que la région codante (environ 300 bases) en effectuant des PCR avec des amorces sens et anti-sens dessinées dans la région codante la plus en 3' possible.

Concernant la détermination des amorces, les deux stratégies homologues et hétérologues se sont avérées d'efficacité variée. Le tableau 1 présente, pour chaque stratégie utilisée, le nombre de gènes que nous avons cherché à amplifier chez le poulet, le nombre de gènes ayant donné un fragment unique après amplification et enfin le nombre de clones qui après séquençage correspondaient bien au gène recherché.

TABLEAU 1 : Résultats des différentes stratégies de clonage

SHP et SHN : amorces hétérologues déterminées après alignement de séquences, respectivement protéiques et nucléotidiques.
SP : amorces homologues poulet déterminées à partir de séquences EST (SP EST) ou non (SP hors EST).

Stratégie utilisée	Nombre de gènes étudiés	Fragments amplifiés et clonés	Fragments ayant la bonne séquence
SHP	10	1	1
SHN	22	17	9
SP hors EST	52	45	43
SP EST	77	75	71
Total	161	138	124

Comme on pouvait s'y attendre, la stratégie la plus efficace a été la stratégie homologue (stratégie SP) : 93% des gènes testés au total ont pu être amplifiés et 95% de ces clones correspondaient bien aux gènes recherchés. Ainsi, 114 des 129 gènes testés par cette stratégie ont été clonés.
Les deux autres stratégies dites hétérologues ont été d'efficacité très médiocre. La stratégie SHP consistant à aligner des séquences protéiques provenant d'espèces les plus divergeantes possibles et de choisir des amorces dégénérées dans les régions les plus conservées s'est avérée peu efficace. Seul 1/10 (10%) des gènes testés par cette méthode ont pu être amplifiés.
La même stratégie, mais cette fois avec des séquences nucléotidiques (stratégie SHN) donne de meilleurs résultats. En effet, 17/22 (77%) des gènes testés par cette méthode ont pu être amplifiés. Cependant 50% (9/17) de ces fragments ont une séquence qui correspond à celle du gène recherché. Ceci est probablement dû au fait que les séquences conservées ayant déterminé le choix des amorces correspondent à des séquences conservées entre gènes orthologues mais aussi entre gènes paralogues (gènes d'une même espèce qui appartiennent à une famille de gènes codant des protéines de fonction assez proches).
Concernant la soixantaine de gènes qui n'ont fait encore l'objet d'aucune tentative de clonage et pour lesquels aucune séquence homologue n'était disponible, la stratégie d'isolement avec des séquences hétérologues n'a pas été poursuivie du fait de sa faible efficacité. Nous sommes donc en attente de séquences homologues. Un tel choix est appuyé par l'émergence croissante de séquences EST de poulet dans les banques de données publiques. Par exemple de nouvelles séquences ESTs générées dans le cadre du programme INRA AGENAE poulet sont attendues. Par ailleurs, une veille automatique a été mise en place avec le logiciel PubCrawler décrit au paragraphe Matériels et méthodes afin de profiter de toute séquence poulet (EST ou non) qui serait déposée dans les banques publiques.
Néanmoins, les 124 gènes aviaires isolés au final, sont représentatifs de l'ensemble des métabolismes étudiés (tableau 2) et nous ont conduit a élaborer une puce.

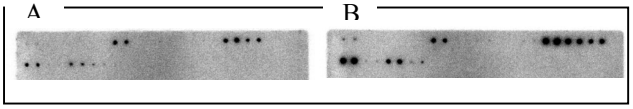
TABLEAU 2 : Répartition des gènes clonés par métabolisme

Métabolismes	Gènes isolés	Gènes répertoriés
Synthèse des acides gras et triglycérides	**6**	6
désaturation des acides gras	**4**	8
lipolyse	**4**	4
ß-oxydation	**5**	9
transport et stockage	**8**	12
métabolisme cholestérol	**8**	19
phospholipides triacylglycérols	**5**	18
glycolyse	**12**	16
pentoses phosphates	**3**	7
néoglucogénèse	**3**	3
cycle de Krebs	**11**	16
corps cétoniques et céramides	**5**	9
transduction de l'insuline	**20**	26
autres hormones	**2**	6
Facteurs de transcription	**24**	53
Divers	**4**	10

Concernant les premiers essais d'hybridations, ils ont été effectués sur des membranes contenant les 124 produits PCR déposés en conditions standards (cf. paragraphe Matériels et méthodes). Les hybridations ont été réalisées avec des cibles complexes issues du marquage d'ARN totaux extraits de foies de poulets commerciaux adultes abattus à l'état nourri. Ces ARN totaux avaient été analysés au préalable en Northern-Blot et présentaient de hauts niveaux d'expression pour certains des gènes déposés, servant ainsi de contrôles positifs. Les résultats d'hybridation n'ont révélé que 3 signaux au niveau de 3 dépôts sur les 124 présents sur la membrane. De tels résultats soulèvent des problèmes de sensibilité dont l'une des causes peut être la trop faible quantité de matériel déposée sur membrane.
Nous avons donc étudié les effets sur la sensibilité d'hybridation, de la quantité de produits PCR déposés sur membrane : les quantités testées étaient 12,5ng, 75ng, 170ng et 300ng. La figure 1 montre les résultats d'hybridations obtenus avec 75ng (en A) et 170ng (en B) de produits PCR déposés.

FIGURE 1 : Hybridation de 2 membranes sur lesquelles 75ng et 170ng de produits PCR de 16 clones ont été déposés

A : 75ng déposés issus de produits PCR concentrés 10 fois (100µl à 300ng/µl) et de 5 allers-retours.
B : 170ng déposés issus de produits PCR concentrés 5 fois (100µl à 170ng/µl) et de 20 allers-retours.
- Gènes spotés en doublets de gauche à droite :
1ère ligne : Aldolase-B; ACL; FAS; EM; ApoA1; SCD1; ATF4; LXRA; SREBP-1; ApoA1-A7*; ApoA1-A8*; ApoA1-H7*;
2ème ligne : ApoA1-H5*; ATF4-G9*; G5-7b*; G1-11d*
* = clones issus d'autres programmes de recherche (et correspondant à la partie la plus 3' terminale des ADNc correspondant). Les conditions de marquage et d'hybridation sont explicitées dans le Matériels et méthodes ; exposition 24h.



Ces résultats mettent clairement en évidence un signal d'intensité croissante en fonction de la quantité de produits PCR déposés. Ce paramètre « quantité déposée» peut déjà être une des explications aux très faibles nombres de signaux d'hybridations observés sur les membranes réalisées en conditions standards. En effet, la quantité déposée en conditions standards était de 5ng, soit 15 fois moins que la plus faible des quantités utilisées en figure 1. Aussi, il est impératif de concentrer les produits PCR avant dépôt sur membrane, pour les expérimentations futures.
Une fois de telles membranes disponibles, un autre paramètre devra être testé : il s'agit de l'amorce utilisée pour initier le marquage des cibles complexes (amorce oligo-d(T) *versus* amorces aléatoires). Les cibles complexes générées avec des amorces oligo-d(T) correspondent aux extrémités 3' des ADNc, celles générées par des amorces aléatoires correspondent à des fragments localisés tout au long de l'ADNc. Ainsi, ces dernières sont susceptibles de mieux s'hybrider avec les fragments déposés sur membrane qui correspondent à une région codante, cette région étant rarement localisée en extrémité 3' des ADNc.
Une fois que les hybridations avec des cibles complexes de type poulet seront satisfaisantes, la puce sera hybridée avec des cibles complexes obtenues à partir d'ARN totaux de foies de canards ou d'oies afin d'évaluer la qualité des hybridations hétérologues.

Conclusion

Une telle approche permettra donc d'étudier simultanément l'expression de tous ces gènes en réponse à différents stimuli connus pour réguler certains d'entre eux, afin de mieux comprendre les réseaux de régulation qui les régissent. Alors que les mécanismes de régulation de ces gènes sont la plupart du temps décrits de manière isolée et principalement chez les mammifères, une telle approche globale permettra d'une part de confirmer ou d'infirmer, pour l'espèce poulet, ces réseaux de régulation déjà décrits et pourrait en révéler de nouveaux.
Trois principaux axes d'études mobiliseront un tel outil :

- Des études dans des modèles animaux de l'espèce poulet : il s'agira de rechercher des différences de profils d'expression des gènes répertoriés entre différents génotypes de poulets (lignées grasses et maigres), ou encore entre des poulets soumis à différents états nutritionnels.
- Des études dans des modèles animaux appartenant aux espèces canard ou oie : sous réserve qu'il y ait une hybridation hétérologue entre les produits PCR déposés sur la puce et des ARN totaux extraits de foies de palmipèdes (canard, oies), nous pourrons également rechercher des différences de profils d'expression entre des génotypes caractérisés par des capacités différentes à faire du foie gras (stéatose hépatique) ou entre des états nutritionnels différents (gavés, non gavés) au sein d'un même génotype voire entre génotypes.
- Des études dans le modèle cellulaire LMH (Leghorn Male Hepatoma) : elles permettraient de faciliter l'interprétation des profils d'expression obtenus dans les modèles animaux en les comparant à ceux obtenus en réponse à des facteurs connus pour réguler le métabolisme hépatique des lipides. Ainsi, nous envisageons d'étudier l'expression de ces gènes, en réponse à des hormones ou des nutriments ou encore en réponse à la surexpression de gènes tels que des facteurs de transcription, l'ensemble de ces facteurs étant connus, bien souvent chez les mammifères, pour réguler le métabolisme hépatique des lipides.

OBTENTION DE LA CARTE GENETIQUE DU CANARD BARBARIE ET DU CANARD PEKIN

Genet Carine[1,2], Vignal Alain[1] et Larzul Catherine[2]

I.N.R.A. - [1]Laboratoire de Génétique Cellulaire - [2] Station d'Amélioration Génétique des Animaux d'élevage, 31326 Castanet-Tolosan.

Résumé

L'amélioration génétique des animaux d'élevage a réalisé des progrès spectaculaires notamment grâce aux marqueurs moléculaires. Pour de nombreuses espèces comme les bovins, les caprins, les porcins et la poule, l'étape préliminaire a consisté à réaliser une carte génétique. Cependant jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'a été menée pour établir la carte génétique du canard qui pourrait être d'une aide précieuse pour la sélection et est l'étape indispensable avant la recherche de gènes d'intérêt agronomique. Pour la réalisation de cette carte génétique nous avons choisi d'utiliser un croisement impliquant des femelles Pékin et des mâles Barbarie, issus de sélectionneurs français et produisant des canards mulards infertiles. Nous avons ainsi choisi environ 200 animaux mulards regroupés dans trois familles de référence. L'obtention des marqueurs microsatellites est en cours par criblage d'une banque d'ADN génomique d'animaux Barbarie et Pékin. Enfin, la carte génétique sera construite à partir des données issues du génotypage de ces marqueurs sur les animaux des 3 familles.

Introduction

L'analyse de la variabilité génétique des animaux d'élevage a réalisé des progrès spectaculaires notamment grâce au développement des marqueurs moléculaires et à l'élaboration de cartes génétiques. En effet, les marqueurs microsatellites s'avèrent utiles pour l'étude de la diversité génétique (Rosenberg et al., 2001) ou pour la détection de gènes ayant un effet majeur (Pitel et al., 2000). Chez la poule, environ 800 microsatellites sont localisés sur la carte génétique consensus (Groenen et al., 2000) et ceux-ci sont largement utilisés pour la cartographie et la détection des gènes agissant sur la variabilité des caractères d'intérêt économique : les QTL (Quantitative Trait Loci) (Tixier-Boichard et al., 1997; Pitel et al., 2002).

Cependant jusqu'à aujourd'hui, aucun travail n'a été mené pour établir la carte génétique du canard. Le canard Pékin est le canard le plus utilisé dans le monde pour la production d'œufs de consommation et de viande. La situation est différente en France puisque c'est le canard de Barbarie qui est principalement utilisé pour la production de viande tandis que le canard mulard, hybride stérile résultant de l'accouplement d'une cane Pékin et d'un canard de Barbarie, est utilisé pour la production de foie gras et de magret. L'objectif de ce projet est d'établir les premières cartes génétiques chez les canards Pékin (*Anas Platyrhyncos*) et Barbarie (*Cairina Moschata*). Dans cet optique un croisement intergénérique produisant des mulards en Génération F2 a été mis en œuvre.

Une des premières étapes pour l'établissement de la carte génétique consiste à développer et caractériser des marqueurs de type microsatellite. Ces marqueurs sont définis comme une succession de courts motifs nucléotidiques, par exemple $(CA)_n$ ou $(GGA)_n$ répétés un certain nombre de fois en des points précis du génome. Ce type de marqueurs présente plusieurs avantages : ils sont très polymorphes et sont régulièrement répartis le long du génome. De plus, ce sont des marqueurs codominants et leur analyse est facilement automatisable. En effet, une simple réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet de déterminer quels sont les deux allèles présents chez chaque animal. Enfin, le calcul des fréquences de recombinaison entre 2 marqueurs, grâce à l'analyse statistique de la transmission des allèles dans des familles de référence informatives, permet d'estimer la distance les séparant. En dernier lieu, un test de la liaison génétique est réalisé par un calcul des rapports de vraisemblance.

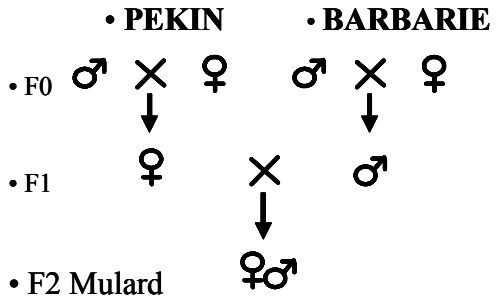
1. Matériels et méthodes

1.1. Obtention des familles de références

Idéalement une famille de référence doit comprendre un nombre important de frères et sœurs afin d'obtenir le maximum d'informations sur la ségrégation des allèles

d'origine paternelle et maternelle. Ces familles sont constituées de 3 générations (F0, F1 et F2) afin de déterminer la phase c'est-à-dire déterminer quelles étaient les associations alléliques parentales pour un chromosome. De plus, afin d'augmenter le niveau d'hétérozygotie des parents F1, les grands-parents F0 utilisés sont issus de populations génétiquement éloignées.
Les animaux de lignées Pékin et Barbarie ont été fournis par trois sélectionneurs français (Grimaud Sélection-Option, Gourmaud Sélection et Sépalm). Ainsi, 8 canetons Barbarie mâles et 8 canetons Pékin femelles issus de chaque sélectionneur ont été élevés et accouplés à la station expérimentale des Palmipèdes à foie gras de l'INRA d'Artiguères (Figure 1). Au total 779 animaux mulards ont été produits. Quelques jours après l'éclosion, une prise de sang a été réalisée pour chaque animal, en vue d'une extraction d'ADN génomique total. Parmi toutes les familles obtenues, les trois familles comportant le plus grand nombre d'animaux mulards ont été sélectionnées (soit respectivement 73, 72 et 51 F2 mulards). Pour chacun des animaux appartenant à ces familles de référence, l'extraction d'ADN a été réalisée au G.I.E. LABOGENA de Jouy-en-Josas.

FIGURE 1 : Obtention des animaux de type mulard. Pour chacune des trois familles de référence, les animaux mulards ont été obtenus à partir de l'accouplement d'un mâle et d'une femelle F1.



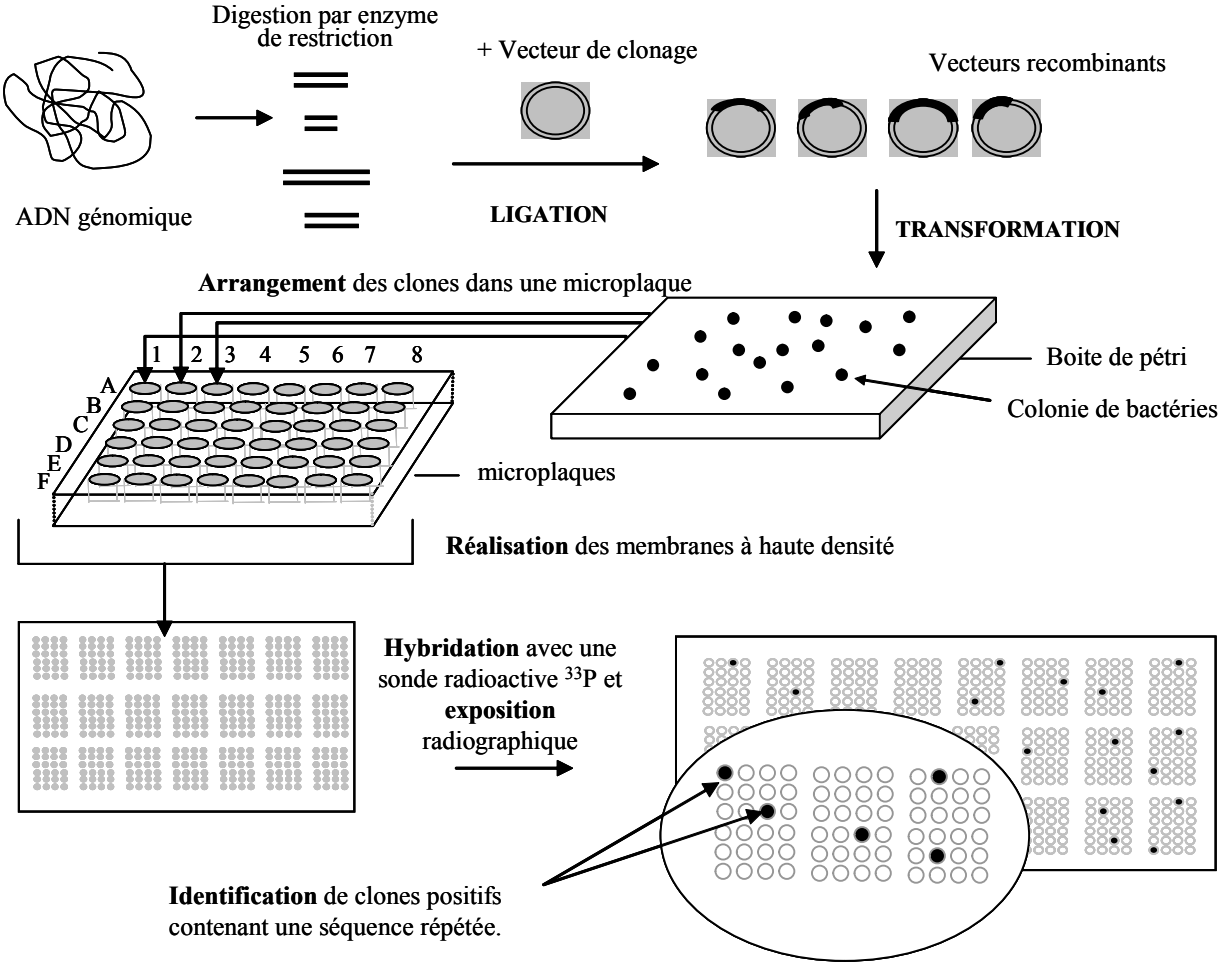
1.2. Obtention de la banque d'ADN génomique

Afin de pouvoir identifier et caractériser des marqueurs microsatellite, il est nécessaire de construire une banque d'ADN génomique. Cependant, des travaux précédents montrent que la fréquence des microsatellites chez les oiseaux est inférieure à celle estimée chez l'homme (Primmer et al., 1997). Par exemple, chez la poule, un microsatellite de type (CA)≥14 est présent tous les 450 000 paires de bases (pb), cette fréquence est ainsi entre 5 et 15 fois inférieure à celle des mammifères (Primmer et al., 1997). Ces mêmes travaux suggèrent que cette estimation est valable chez le canard, et qu'ainsi si l'on clone le génome par fragments d'ADN de 1 000 pb, il est nécessaire d'analyser au moins 450 clones pour identifier un microsatellite. Ce travail à grande échelle implique soit la construction d'une banque d'ADN génomique ordonnée (nécessitant l'utilisation de robots) soit d'enrichir la banque en séquences microsatellites. Ayant la possibilité d'utiliser les robots de la génopôle Toulousaine, nous avons ainsi choisi de construire une banque ordonnée, dont le transfert automatisé sur des filtres à haute densité permet le criblage simultané d'un nombre important de clones (Figure 2).
L'ADN génomique utilisé est un mélange d'ADN d'un canard Pékin et d'un canard de Barbarie. Le rendement du séquençage étant optimum pour des clones contenant des inserts de 800 à 1 500 paires de bases, l'ADN est découpé en fragments à l'aide d'une enzyme de restriction puis les fragments sont séparés selon leur taille sur gel d'agarose. Ceux de 800 à 1 500 pb sont extraits à l'aide d'un kit QIAEXII (Quiagen) et insérés dans un vecteur (Zero background cloning kit, Invitrogen) par ligation. Les clones recombinants sont ensuite transformés dans des bactéries compétentes qui sont alors étalées et cultivées sur un milieu nutritif gélosé. Chaque clone résultant est prélevé par un robot (Biopick de Biorobotics) et ordonné dans une plaque 384 puits. Les 24 colonnes de la plaque sont numérotées (1 à 24) et chaque ligne est identifiée par une lettre (A à P), permettant ainsi d'attribuer des coordonnées à chaque clone (Figure 3).
L'ordonnancement des clones en plaques et l'automatisation des dépôts de fraction de suspension bactérienne (robot Microgrid de Biorotics) permet également de produire des membranes à haute densité comportant au maximum 36 000 clones (ou 18 000 clones déposés deux fois) placés selon un schéma bien précis. Ces membranes (Immobilon-Ny+ de millipore) subissent un traitement classique (http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/C7486) et sont hybridées avec une sonde radioactive $(CA)_n$. Ce criblage permet de révéler par autoradiographie les clones contenant un motif répété. Le séquençage permet de vérifier qu'ils contiennent effectivement un microsatellite et de définir des amorces qui permettront d'amplifier spécifiquement ce marqueur par PCR.

2. Etat d'avancement du projet

Nous avons mené des études de faisabilité et avons défini les conditions optimales pour l'automatisation de la construction de la banque. Ainsi, la digestion de l'ADN génomique total par l'enzyme de restriction NdeII fourni un profil de restriction plus homogène que

Figure 2 : Construction et criblage d'une banque d'ADN génomique



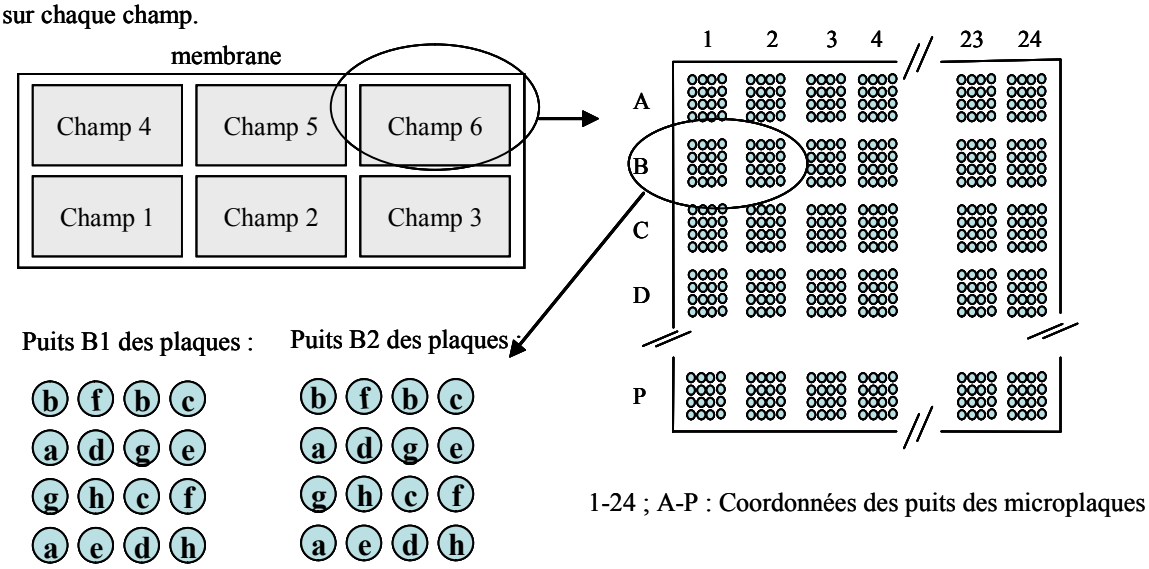
les autres enzymes testées, nous permettant de cloner des fragments d'une taille proche de 1 000 pb. A ce jour, la banque plasmidique d'ADN génomique réalisée au laboratoire comporte environ 164 000 clones répartis dans 427 plaques de 384 puits.

L'obtention des membranes à haute densité est en cours, chacune comportant 18 000 clones déposés en double (Figure 3). Nous avons réalisé un premier criblage d'une membrane avec une sonde $(CA)_{15}$. Les clones ayant donné un signal d'hybridation positif sont en cours de séquençage. Le criblage entier de notre banque permettra à terme d'estimer avec précision la fréquence des microsatellites de type $(CA)_n$ chez le canard. La réalisation des membranes à haute densité permet également de tester facilement la présence d'autres types de microsatellites de type di-, tri- ou tétra-nucléotidiques par ré-hybridation avec les sondes adéquates. Nous souhaitons notamment confirmer ou infirmer les résultats précédemment obtenus chez le canard Pékin, suggérant que les répétitions tri- ou tétranucléotidiques seraient plus fréquentes que celles de type dinucléotidiques (S. Maak, communication personnelle). Le criblage des membranes avec des sondes de type $(GGA)_n$ ou $(GGAA)_n$ sera donc entrepris.

Parallèlement, nous avons réalisé une étude préliminaire de l'informativité potentielle de nos familles de référence. Quelques microsatellites développés chez le canard Pékin et dont les séquences sont disponibles dans la littérature ont été génotypés sur séquenceur automatique ABI 377. Les premiers résultats suggèrent une forte informativité pour ces marqueurs et montrent qu'ils sont également exploitables chez le canard de Barbarie. Seuls deux microsatellites sur les 17 testés ne produisent pas de produits d'amplification sur les animaux Barbarie.

Nos travaux représentent ainsi les premiers pas vers l'obtention d'un nombre important de microsatellites polymorphes chez les canards Pékin et Barbarie, ouvrant ainsi la voie vers la réalisation de cartes et la

Figure 3 : Composition des membranes à haute densité. Chaque membrane est découpée en six champs. Huit plaques 384 puits (nommées ici de a à h) sont déposées en duplicate selon un profil de dépôt bien précis sur chaque champ.



détection systématique des gènes influençant les caractères d'intérêt agronomique, pouvant mener à terme à une amélioration de l'efficacité de la sélection chez le canard.

Remerciements

Les auteurs remercient le Ministère de l'Agriculture, de l'alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales pour le financement de ce projet. Ils remercient également toutes les personnes de la Station des Palmipèdes à Foie Gras d'Artiguères et de la Station d'Amélioration Génétique des Animaux qui se sont impliqués dans la constitution des familles.

Références bibliographiques

Groenen, M. A., H. H. Cheng, N. Bumstead, B. F. Benkel, W. E. Briles, T. Burke, D. W. Burt, L. B. Crittenden, J. Dodgson, J. Hillel, S. Lamont, A. P. de Leon, M. Soller, H. Takahashi and A. Vignal (2000). *Genome Research.* **10**(1): 137-47.

Pitel, F., R. Berge, G. Coquerelle, R. P. M. A. Crooijmans, M. A. Groenen, A. Vignal and M. Tixier-Boichard (2000). *Genet. Sel. Evol.* **32**: 73-86.

Pitel, F., S. Lagarrigue, P. Le Roy, F. Plisson-Petit, Y. Amigues, A. Neau, A. Cahaner, J. Hille, M. Sourdioux, B. Leclercq, A. Vignal and M. Douaire (2002). 7th world congress on genetics applied to livestock production, Montpellier, France. communication 04-37

Primmer, C. R., T. Raudsepp, B. P. Chowdhary, A. P. Moller and H. Ellegren (1997). *Genome Res.* **7**(5): 471-82.

Rosenberg, N. A., T. Burke, K. Elo, M. W. Feldman, P. J. Freidlin, M. A. Groenen, J. Hillel, A. Maki-Tanila, M. Tixier-Boichard M, Vignal A., Wimmers K. and Weigend S. (2001). **159**(2): 699-713.

Tixier-Boichard, M., M. Douaire, C. Beaumont and J. M. Elsen (1997). *journées de la Recherche Avicole.* **2**: 41-48.

FECONDATION *IN VITRO* D'OVOCYTES DE POULES OVULES *IN VITRO*

Batellier Florence[1], Couty Isabelle[1], Olszanska Bozenna[2], Stepinska Ursula[2] et Brillard Jean Pierre[1]

[1] INRA SRA, Equipe qualité des gamètes et des embryons - 37380 Nouzilly-FRANCE
[2]Institute of Genetics and animal breeding of Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec- POLAND

Résumé

Chez les oiseaux, malgré un énorme potentiel biologique et économique, les méthodes de fécondation et d'ovulation *in vitro* sont encore très peu explorées. L'objectif de notre travail a été d'adapter une méthode de maturation et d'ovulation *in vitro* et de l'associer à la fécondation *in vitro* et à la culture *in vitro* des embryons (24 heures). Nous avons utilisé 57 poules Isabrown et nous avons recueilli 52 follicules péri-ovulatoires dont 27 (52%) pré-ovulatoires. Trente six ovocytes ont été inséminés après ovulation (16 ovocytes pré-ovulatoires n'ont pas ovulé *in vitro*). Trente et un (86%) embryons ont pu être observés à la loupe binoculaire, mais seuls 18 (58%) d'entre eux ont révélé la présence de noyaux dans les cellules. Les autres embryons qui semblaient avoir un développement normal ne contenaient que des cellules sans noyau. En conclusion, nous avons obtenu 50% (18/36) d'embryons nucléés à partir des ovocytes inséminés après ovulation. Ce résultat encourageant constitue une première étape vers la maîtrise des stades qui séparent l'ovulation de la production *ex ovo* d'un poussin.

Introduction

L'amélioration de la connaissance des mécanismes de fécondation et de développement embryonnaire précoce ainsi que du contrôle de la reproduction des animaux d'élevage ont largement contribué au développement des biotechnologies et de leurs applications.
Dans les espèces avicoles, malgré un énorme potentiel biologique et économique, les méthodes de fécondation et d'ovulation *in vitro* restent encore très peu explorées.
Plusieurs étapes doivent être distinguées au cours de la reproduction des oiseaux : ovogenèse, maturation ovocytaire, ovulation, fécondation, développement embryonnaire (précoce puis tardif) et éclosion. La maîtrise *in vitro* de ces différentes étapes doit permettre l'étude de leurs mécanismes. Parmi ces étapes, la culture *in vitro* des embryons à partir du stade « une cellule » jusqu'à l'éclosion est possible (Perry 1988), la maturation et l'ovulation *in vitro* ont été mises au point chez la caille par Olszanska et al (1996) et la fécondation *in vitro* réalisée par Nakanishi et al (1991).
Plus récemment, la combinaison de ces différentes étapes : maturation, ovulation, fécondation et développement précoce *in vitro* a également été réalisée intégralement par Olszanska et al (1999, 2002) toujours chez la caille.
L'objectif de notre travail a été l'adaptation de la combinaison des mêmes techniques chez la poule afin de disposer du matériel biologique nécessaire à l'étude des différents mécanismes qui accompagnent la fécondation.

1. Matériels et méthodes

Nous avons utilisé 57 poules Isabrown âgées de 45 semaines et logées en cages individuelles munies d'un dispositif d'enregistrement de l'heure de ponte. Les poules ont été sacrifiées 10 à 15 minutes après la ponte.
Nous avons alors prélevé l'ovocyte « péri-ovulatoire », c'est à dire que nous avons recueilli l'ovocyte soit juste avant l'ovulation (sur l'ovaire), soit juste après l'ovulation (au niveau de l'infundibulum).
Les ovocytes ovulés *in vivo* ont été recueillis directement dans le récipient décrit ci après.
Pour les ovocytes pré-ovulatoires, nous avons ligaturé le follicule au niveau du pédoncule qui le relie à l'ovaire avant l'ovulation. Les ovocytes pré-ovulatoires ont été maintenus en suspension (attachés au couvercle par leur pédoncule) dans un verre à pied à fond conique contenant du milieu de Dulbecco supplémenté par de la BSA (fraction V) et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les verres à pied ont ensuite été placés dans un incubateur à 41°C.
Après ovulation *in vitro*, une insémination a été réalisée par dépôt de 20 µl de sperme dilué au 1/600 (soit une dose totale d'environ 200.10^6 spermatozoïdes) sur le disque germinal. Après 10 minutes d'incubation à 41°C, les ovocytes inséminés ont été rincés pour retirer les spermatozoïdes excédentaires puis placés 20 à 24 heures dans un incubateur à 41°C.
Le jour suivant, les blastodermes ont été disséqués et observés sous une loupe binoculaire pour déterminer

leur stade de développement selon la classification de Eyal Giladi et Kochav (1976).
Les blastodermes ont ensuite été colorés par du Hoechst 342 sans fixation préalable puis observés en microscopie optique à fluorescence pour visualiser les noyaux.

2. Résultats

Sur les 57 poules sacrifiées, nous avons recueilli 52 follicules dits « F1 ». Quatre ont été cassés lors du prélèvement et un a été confondu avec un follicule « F2 ». Nous avons donc obtenu un taux de collecte de 91.2%.
Sur les 52 follicules « F1 » péri-ovulatoires : 27 (52%) ont été des follicules pré ovulatoires, 9 (17.3%) ont ovulé au moment de la dissection, 8 (15.4%) ont ovulé avant la dissection et ont été retrouvés avant leur entrée dans l'infundibulum, 7 (13.5%) ont été retrouvés dans l'infundibulum et 1 (2%) a été retrouvé dans le magnum.
Sur les 27 follicules « F1 » pré-ovulatoires mis à maturer et ovuler *in vitro*, 11 (41%) ont ovulé alors que 16 (59%) n'ont pas ovulé.
Les résultats concernant le pourcentage de développement embryonnaire et la présence de noyaux dans les blastodermes observés sont présentés dans le Tableau 1. Sur 11 ovocytes « ovulés *in vitro* » et inséminés, nous avons obtenu 9 développements embryonnaires (observés à la loupe binoculaire), un œuf cassé et un sans aucun développement. Sur 9 ovocytes ayant ovulé « juste au moment de leur prélèvement », nous avons obtenu 8 développements embryonnaires (observés à la loupe binoculaire) et un œuf sans aucun développement. Sur 8 ovocytes ayant déjà ovulé « au moment de la collecte » mais n'étant pas encore engagés dans l'infundibulum, nous avons obtenu 7 développements embryonnaires (observés à la loupe binoculaire), et un œuf cassé. Sur 7 ovocytes ayant déjà ovulé « au moment de la collecte » et recueillis dans l'infundibulum, nous avons obtenu 6 développements embryonnaires (observés à la loupe binoculaire), et un œuf cassé. Un seul ovocyte ayant pourtant été collecté 10 minutes après l'heure de ponte a été retrouvé dans le magnum. Nous n'avons pas observé de développement embryonnaire à partir de cet ovocyte. Enfin, le seul follicule F2 collecté, n'a pas ovulé *in vitro* et n'a pas été inséminé.
Le Tableau 2 reprend les résultats du développement embryonnaire et de la présence des noyaux révélés par marquage au Hoechst 342. Trente six ovocytes ont été « inséminés » *in vitro*. Trente et un ont montré un développement embryonnaire après observation à la loupe binoculaire. Les stades de développement observés ont été : stade IX (1 embryon, sans présence de noyaux), stades IV à VI (22 embryons dont 15 ont présenté des noyaux par marquage au Hoechst 342), stade II (8 embryons dont 3 ont présenté des noyaux par marquage au Hoechst 342).
Nos résultats sont très différents de ceux précédemment publiés par Olszanska et al (1999 et 2002). Nous confirmons ici des observations faites par Olszanska et al chez la caille, qui indiquent un retard quasi systématique du développement du jeune embryon issu de fécondation *in vitro*. En effet, le stade le plus avancé observé ici 24 heures après la fécondation est un stade IX (un seul cas sur 31 embryons), la majorité des embryons observés ayant seulement atteint le stade IV à VI. *In vivo*, 24 heures après la fécondation, les embryons ont atteint le stade X. Le pourcentage d'embryons se développant avec une apparence normale après fécondation et/ou ovulation *in vitro* est plus élevé dans notre travail que dans l'étude effectuée chez la caille (86% *versus* 35% respectivement). Le pourcentage d'embryons présentant effectivement des noyaux après marquage au Hoechst 342 est également plus élevé dans notre travail (58% *versus* 32% respectivement).
Plusieurs différences sont à noter : notre travail a été réalisé sur l'espèce poule alors que le travail précédant a été réalisé sur la caille. Chez la poule, dans notre étude, le taux d'ovocytes ovulés au moment de la collecte des ovocytes et donc avant la mise en maturation *in vitro* a été plus élevé que dans le travail cité. Nous avons néanmoins utilisé tous ces ovocytes après ovulation *in vivo* afin de disposer d'un maximum de matériel à inséminer. Nous avons obtenu un résultat plus faible concernant le taux d'ovulation *in vitro*, sans doute dû en partie à notre manque d'expérience et en partie à un manque d'adaptation de la technique à l'espèce poule.

Conclusion

En conclusion, nous avons obtenu 50% (18/36) d'embryons nucléés à partir des ovocytes inséminés après ovulation. Ce résultat encourageant constitue une première étape vers la maîtrise des différents stades qui séparent l'ovulation de la production *ex ovo* d'un poussin.

Références bibliographiques

Eyal Giladi H. et Kochav S., 1976. Dev. Biol., 49., 321-337.
Nakanishi A. et al, 1991. Mol. Repr. Dev., 28., 131-135.
Olszanska B. et al, 1996. British Poultry Sci., 37, 929-935.
Olszanska B. et al, 1999. Conférence Internationale sur la Reproduction des oiseaux, Tours, 22-24 septembre 1999.
Olszanska B. et al, 2002. J. Exp. Zool., 292, 580-586.

Perry M.M., 1988. Nature. 331, 70-72.

TABLEAU 1 : Devenir des ovocytes à chaque étape expérimentale

	Réussite collecte	**F1**	**Ovulation à la collecte**	**MIV**	**Cellules**	**Noyaux**
57 poules	53 ovocytes collectés (93%)	52 Follicules F1 (98%)	27 F1 (52%)	11 ⊕ (41%)	1 stade IX	(-)
					5 stades IV	3 ⊕
					3 stades II	(-)
					1 (-)	(-)
					1 cassé	
				16 (-)		
			9 ovulent à la collecte (17.3%)		5 stades IV	4 ⊕
					3 stades II	1 ⊕
					1 (-)	(-)
			8 ont ovulé à la collecte (15.4%)		6 stades IV	5 ⊕
					1 stade II	1 ⊕
					1 cassé	
			7 retrouvés dans l'infundibulum (13.5%)		5 stades IV	2 ⊕
					1 stade II	1 ⊕
					1 cassé	
			1 dans le magnum (2%)		1 stade IV	1 ⊕
		1 F2		0	0	ovocyte
	4 perdus					

MIV : maturation in vitro
F1 : follicule 1 (le plus gros sur la grappe ovarienne)

TABLEAU 2 : Développement embryonnaire et présence de noyaux dans les embryons

	Développement	**Présence de noyaux**
36 inséminations réalisées	1 embryon stade IX (2.7%)	(-)
	22 embryons stades IV à VI (61.1%)	15 (68%) ⊕ 7 (-)
	8 embryons stade II (22.2%)	3 (37.5%) ⊕ 5 (-)
	2 sans développement (5%)	(-)
	3 cassés (8.3%)	

LA VARIABILITE DES CAPACITES DE DIGESTION DES REGIMES A BASE DE BLE A UNE FORTE COMPOSANTE GENETIQUE CHEZ LE POULET DE CHAIR

Mignon-Grasteau Sandrine[1], Muley Nitin[1], Bastianelli Denis[2], Gomez Joëlle[1], Hallouis Jean-Marc[1], Besnard Joël[1], Millet Nicole[1], Carré Bernard[1]

[1] INRA, Station de Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly
[2] Cirad-emvt, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5

Résumé

Les paramètres génétiques de l'efficacité de la digestion d'un régime contenant 55% de blé et 8% d'huile de colza ont été estimés chez le poulet de chair. L'énergie métabolisable corrigée pour un bilan azoté nul (EMAn) et le coefficient d'utilisation digestive de la matière sèche (CUD) ont été mesurés individuellement entre 19 et 22 jours sur 432 animaux de pedigree connu. Les EMAn et CUD moyens étaient, respectivement de 12,86 MJ/kgMS et 64,5%. Les coefficients de variation respectifs étaient de 12,4% et 11,4%. Les minima observés étaient de 4,67 MJ/kgMS et 25,9%, les maxima de 15,43 MJ/kgMS et 78,5%, respectivement. L'EMAn et le CUD présentaient une forte héritabilité (0,50 $\pm$ 0,06 et 0,52$\pm$0,09). La consommation alimentaire était fortement et négativement corrélée à l'EMAn (- 0,70 $\pm$ 0,10 à - 0,73 $\pm$ 0,08 selon le stade). L'indice de consommation était également fortement et négativement corrélé à l'EMAn (- 0,70 $\pm$ 0,11 à – 0,90 $\pm$ 0,04 selon le stade). En revanche, les corrélations génétiques entre l'EMAn et les poids mesurés aux différents âges étaient faibles (-0,06 $\pm$ 0,06 à 1 jour, -0,11 $\pm$ 0,19 à 12 jours, -0,12 $\pm$ 0,07 à 19 jours et 0,01 $\pm$ 0,06 à 22 jours).

Introduction

Le blé peut être utilisé comme source majeure d'énergie dans les régimes destinés aux poulets de chair, d'autant plus que le prix du blé tend à diminuer par rapport aux autres sources énergétiques. Cependant, les réponses des animaux à différents types de blé peuvent être très variables, et même avec une même variété, une forte variabilité individuelle persiste (Carré et al., 2002).
L'objectif de notre étude était d'évaluer la part de cette variabilité qui était d'origine génétique, afin de tester les possibilités d'amélioration génétique des paramètres d'efficacité de digestion chez le poulet de chair alimenté avec un régime basé sur un blé "visqueux" à dureté relativement élevée. Les paramètres d'efficacité de la digestion retenus étaient le Coefficient d'Utilisation Digestive de la matière sèche (CUD) et l'Energie Métabolisable corrigée pour un bilan Azoté nul (EMAn).

1. Matériels et méthodes

Un total de 432 animaux des deux sexes et de pedigree connu (d'une lignée commerciale) a été nourri dès l'âge de 7 jours avec un régime granulé contenant 55% de blé de la variété Rialto et 8% d'huile de colza. La Viscosité Utile Réelle (VUR) du régime était de 2,5 ml/g. Les animaux ont été pesés à 1 jour, 12, 19 et 22 jours (P1, P12, P19, P22). L'indice de consommation (IC), la consommation résiduelle (RES), la consommation alimentaire (CONSO) ont été mesurés individuellement entre 12 et 19 jours d'une part, entre 19 et 22 jours d'autre part. L'énergie métabolisable corrigée pour un bilan azoté nul (EMAn) et la digestibilité de la matière sèche (CUD) ont été mesurées individuellement entre 19 et 22 jours par collecte totale avec une alimentation *ad libitum* de 54h et des jeûnes de 18h avant et après l'alimentation. L'énergie brute (EB) des excrétas lyophilisés a été mesurée par spectrophotométrie dans le proche infra-rouge sur la base de 100 échantillons d'excrétas de l'expérience mesurés à la bombe calorimétrique et utilisés comme standard. L'écart-type de prédiction de l'EB des excrétas était de 0,124 MJ/kg.
Les variables dont la distribution était loin d'une distribution normale ont été transformées. Une transformation logarithmique a été utilisée pour RES, une transformation de Box-Cox a été effectuées pour l'IC et l'EMAn. Les paramètres génétiques (héritabilité et corrélations génétiques) de ces

caractères ont ensuite été estimés avec le logiciel VCE4, avec le modèle suivant :

$$y_{ijklm} = \mu + S_i + H_j + C_k + B_l + ET_m + a_n + e_{ijklmn}$$

où y_{ijklmn} est la performance de l'animal n (EMAn plus l'un des autres caractères), μ la moyenne générale, S_i l'effet du $i^{ème}$ sexe, H_j l'effet du $j^{ème}$ lot (3 lots), C_k l'effet de la $k^{ème}$ cellule (2 cellules), B_l l'effet de la $l^{ème}$ position de la cage dans la cellule (en bordure ou centrale), ET_m l'effet du $m^{ème}$ étage de la cage (haut, milieu ou bas), a_n l'effet génétique additif et e_{ijklmn} le résidu. Le modèle diffère selon les caractères étudiés, en fonction de la significativité des différents effets fixés. Un effet maternel a également été ajouté pour le poids à 1 jour.

2. Résultats

2.1. Statistiques élémentaires

Les statistiques élémentaires concernant les variables étudiées figurent dans le Tableau 1. Les EMAn et CUD moyens sont de 12,86 MJ/kgMS et 64,5%, respectivement. Les coefficients de variation respectifs sont de 12,4 et 11,4%. Les minima observés sont de 4,67 MJ/kgMS et 25,9%, les maxima de 15,43 MJ/kgMS et 78,5%, respectivement. L'EMAn moyenne observée est très similaire à la valeur (12,89 MJ/kgMS) obtenue dans une étude précédente (Carré et col., 2002) avec un blé Rialto et une formulation alimentaire peu différente.

TABLEAU 1 : Statistiques élémentaires sur les caractères étudiés

Caractères	Age	Moyenne± Ecart type
Poids (g)	1 jour	39,9±3,7
	12 jours	171,0±24,1
	19 jours	335,5±42,6
	22 jours	421,6±51,3
Gain de poids (g)	12-19 jours	164,5±29,7
	19-22 jours	85,6±18,6
Consommation alimentaire (g MS)	12-19 jours	267,7±42,4
	19-22 jours	151,0±25,5
Indice de Consommation (MS)	12-19 jours	1,67±0,37
	19-22 jours	1,86±0,72
Consommation résiduelle (g MS)	12-19 jours	0,01±31,68
	19-22 jours	0,00±21,55
CUD MS (%)	19-22 jours	64,5±7,4
EMAn (MJ/kgMS)	19-22 jours	12,86±1,60

2.2. Héritabilités

Les caractères de capacités digestives (EMAn et CUD) présentent une forte héritabilité (cf. Tableau 2). Les caractères liés à la consommation alimentaire présentent des héritabilités plus modérées (0.31 pour la consommation résiduelle de 12 à 19 jours à 0.48 pour l'indice de consommation de 19 à 22 jours). Ces valeurs sont en accord avec les estimations d'héritabilité de la littérature, soit 0.27-0.33 pour la consommation résiduelle chez l'adulte (Tixier-Boichard et al., 1995), 0.33-0.55 pour la consommation alimentaire chez le poulet en croissance (Bernon et Chambers, 1988 ; Pym et al., 1991 ; Wang et al., 1991 ; Chambers et al., 1994) et 0.40-0.50 pour l'indice de consommation (Pym, 1990). Les caractères de croissance (poids et gain de poids) présentent des héritabilités faibles à modérées, l'héritabilité du poids augmentant avec l'âge.

2.3. Corrélations génétiques avec l'EMAn

La corrélation génétique entre l'EMAn et le CUD (cf. Tableau 3) est non significativement différente de 1. Les caractères liés à la consommation alimentaire présentent de fortes corrélations négatives avec l'EMAn (-0.70 pour l'indice de consommation et la consommation alimentaire de 12 à 19 jours à –0.91 pour la consommation résiduelle de 19 à 22 jours). La corrélation génétique entre l'EMAn et les caractères de croissance (poids et gain de poids) est non significativement différente de 0, sauf pour le gain de poids entre 19 et 22 jours.

TABLEAU 2 : Héritabilité des variables étudiées

Caractère	Age	h^2 ± Ecart type
Poids	1 jour	0.14±0.01
	12 jours	0.19±0.07
	19 jours	0.28±0.09
	22 jours	0.37±0.10
Gain de poids	12-19 jours	0.22±0.06
	19-22 jours	0.31±0.05
Consommation alimentaire	12-19 jours	0.38±0.05
	19-22 jours	0.37±0.05
Indice de Consommation	12-19 jours	0.34±0.06
	19-22 jours	0.48±0.08
Consommation résiduelle	12-19 jours	0.31±0.06
	19-22 jours	0.40±0.07
CUD	19-22 jours	0.52±0.09
EMAn	19-22 jours	0.50±0.06

TABLEAU 3 : Corrélations génétiques avec EMAn

Caractère	Age	r_g ± Ecart type
Poids	1 jour	-0.06±0.06
	12 jours	-0.11±0.19
	19 jours	-0.12±0.07
	22 jours	0.01±0.06
Gain de poids	12-19 jours	-0.10±0.18
	19-22 jours	0.32±0.15
Consommation alimentaire	12-19 jours	-0.70±0.10
	19-22 jours	-0.73±0.08
Indice de Consommation	12-19 jours	-0.70±0.11
	19-22 jours	-0.90±0.04
Consommation résiduelle	12-19 jours	-0.84±0.07
	19-22 jours	-0.91±0.04
CUD	19-22 jours	0.99±0.01

Ces paramètres génétiques montrent qu'il doit être possible d'améliorer par sélection les capacités de digestion des régimes à base de blé chez le poulet, sans modifier les performances de croissance. Une expérience de sélection divergente a donc été engagée sur l'EMAn, à poids à 22 jours constant.

Conclusion

Les premières estimations d'héritabilité de l'EMAn d'un régime à base de blé chez le poulet de chair en croissance sont encourageantes, et parfaitement compatibles avec la sélection sur ce caractère. Sa corrélation génétique avec le poids indique qu'améliorer l'EMAn peut se faire sans modifier le poids. Les fortes corrélations génétiques entre l'EMAn et l'indice de consommation montrent qu'une sélection sur l'indice en utilisant des régimes d'un type analogue à celui de la présente étude entraînerait probablement une amélioration sensible des capacités digestives des poulets. Il reste maintenant à affiner ces estimations génétiques sur un échantillon de plus grande taille et à estimer les corrélations génétiques avec le poids à l'abattage ou les capacités d'utilisation digestive des différents composants de la ration.

Enfin, les lignées D+ (bons digesteurs) et D- (mauvais digesteurs) actuellement en cours de sélection serviront de modèles explicatifs, mais constitueront également des outils puissants pour tester l'effet des aliments sur le fonctionnement et l'efficacité de l'appareil digestif.

Références bibliographiques

Bernon D.E., Chambers J.R., 1988. Poult. Sci., 67, 1497-1504.

Carré B., Idi A., Maisonnier S., Melcion J.P., Oury F.X., Gomez J., Pluchard P, 2002. Brit. Poultry Sci., 43, 403-415.

Chambers J.R., Wang L., McMillan I., 1994. Poult.Sci., 73, 1196-1203.

Pym R.A.E., 1990. In : Poultry Breeding and Genetics (R.D. Crawford edit.) Elsevier, Amsterdam, 847-876.

Pym R.A.E., Johnson R.J., Etse D.B., Eason P., 1991. Brit. Poult. Sci., 32, 285-293.

Tixier-Boichard M., Boichard D., Groeneveld E., Bordas A., 1995. Poult. Sci., 74, 1245-1252.

Wang L., Chambers J.R., McMillan I., 1991. Poult.Sci., 70, 440-446.

PERSISTANCE DES PERFORMANCES DE REPRODUCTION CHEZ LE CANARD DE BARBARIE

Retailleau Bernard, Blanchet Magali

GRIMAUD FRÈRES SÉLECTION, la Corbière, 49450 Roussay

Résumé

Comparativement à d'autres volailles, la phase de reproduction effective du canard de barbarie est relativement courte : seulement 50 % de sa carrière en 2 pontes contre 65 % chez certaines espèces en 1 ponte. Les performances de ponte ont bien progressé et atteignent aujourd'hui environ 210 œufs/cane en 43 semaines. Une des solutions pour réduire les coûts de production consiste à allonger les pontes mais il faut améliorer la fertilité. Deux essais de renouvellement des mâles montrent que l'on peut maintenir une très bonne fertilité pendant 30 semaines mais la ponte devient alors le facteur limitant et le bilan économique n'est pas favorable.
La sélection pour une 1ère ponte de 30 semaines au lieu de 22 donne des premiers résultats encourageants (plus de 160 œufs/femelle) mais des essais complémentaires sur les techniques d'élevage sont nécessaires pour pouvoir modifier la durée d'exploitation des canes barbarie sur le terrain.

Introduction

La recherche et la sélection ont permis de faire reproduire le canard de barbarie à contre saison et d'améliorer considérablement les performances de reproduction mais le cycle de reproduction n'a pas été modifié depuis 25 ans. La période d'élevage est toujours de 29 semaines suivie d'une 1ère ponte de 22 semaines puis d'une mue de 13 semaines et d'une 2ème ponte de 21 semaines. La phase "productive" ne représente donc que 50 % de la carrière d'un reproducteur alors qu'elle est environ de 65 % pour la poule reproductrice et pour la cane commune.
La recherche d'une meilleure précocité pose des problèmes au niveau du poids d'œufs et les tentatives de raccourcissement de la mue n'ont pas donné de résultats intéressants (Sauveur et al., 1990).
Concernant les performances de reproduction, c'est l'augmentation du nombre d'œufs pondus qui a été la plus spectaculaire : en 25 ans il est passé de 130 à 210 pour 43 semaines de ponte.
L'éclosabilité a également bien progressé, grâce notamment aux techniques d'incubation mais la fertilité a peu évolué.
Nous avons donc mis en place 2 expérimentations avec pour objectifs d'acquérir des informations sur l'allongement de la 1ère ponte et de tester l'effet du renouvellement des mâles sur la persistance de la fertilité.
Parallèlement nous conduisons un programme de sélection visant à augmenter la durée de 1ère ponte.

1. Matériels et méthodes

1.1. 1er essai

- L'essai a été réalisé sur un troupeau de 980 mâles CR et 3 500 femelles CA (parentaux du R51) en reproduction naturelle.
- Sur 2/3 du troupeau (= lot identifié "Renouvellement"), tous les mâles ont été remplacés à l'âge de 47 semaines (soit la 17ème semaine de ponte) par des jeunes mâles âgés de 26 semaines avec maintien du sex-ratio.
- Aucun changement sur l'autre partie du troupeau (= lot "Témoin").
- La ponte a été prolongée jusqu'à l'âge de 61 semaines soit 31 semaines de 1ère ponte.
- Alimentation à volonté pendant toute la ponte avec un aliment cane pondeuse (EM : 2 850 Kcal/kg ; MPB : 16,5 % ; Lysine : 0,80 % ; Méthionine + Cystine : 0,7 %).
- Programme lumineux maintenu à 16 heures de lumière par jour à partir de l'âge de 47 semaines.

1.2. 2ème essai

- L'essai a été réalisé sur un troupeau de 700 mâles et 2 500 femelles de type "lourd" en reproduction naturelle.
- Sur 80 % du troupeau (= lot identifié "Renouvellement"), tous les mâles ont été remplacés à l'âge de 45 semaines (soit la 15ème semaine de ponte) par des jeunes mâles âgés de 29 semaines avec maintien du sex-ratio.
- Aucun changement sur l'autre partie du troupeau (= lot "Témoin").

- La ponte a été prolongée jusqu'à l'âge de 59 semaines soit 29 semaines de 1ère ponte.
- Alimentation à volonté pendant toute la ponte avec un aliment cane pondeuse (EM : 2 850 Kcal/kg ; MPB : 16,5 % ; Lysine : 0,80 % ; Méthionine + Cystine : 0,7 %).
- Programme lumineux maintenu à 16 heures de lumière par jour à partir de l'âge de 47 semaines.

1.3. La sélection

Depuis 5 ans le programme de sélection a été modifié pour prendre en compte les performances de reproduction jusqu'à 30 semaines au lieu de 22 auparavant.
L'enregistrement de la ponte individuelle est donc poursuivi jusqu'à 30 semaines pour tous les candidats à la sélection.
Les canes barbarie sont élevées au sol jusqu'à 24 semaines puis sont placées en cages individuelles pour toute la ponte.
La fécondation est réalisée par insémination artificielle avec un rythme variable selon le type de test de fertilité.
La sélection est réalisée avec le concours du SYSAAF (Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français) pour la mise au point des logiciels et le conseil génétique.

2. Résultats – Commentaires

2.1. Essais

TABLEAU 1 : Performances de ponte : Essai N°1

Période	Nb œufs pondus par femelle présente		
	Témoin	Renouvel.	Significat. statistique
1 à 16 sem.	86,8	86,6	NS
17 à 22 sem.	32,2	30,8	**
Cum.22 sem.	119,0	117,4	**
23 à 31 sem.	29,7	28,4	**
Cum.31 sem.	148,7	145,9	**

*** : P < 0,01*
** : 0,05 > P > 0,01*
NS : P > 0,05

TABLEAU 2 : Performances de ponte : Essai N°2

Période	Nb œufs pondus par femelle présente		
	Témoin	Renouvel.	Significat. Statistique
1 à 14 sem.	69,9	70,0	NS
15 à 22 sem.	34,1	32,6	*
Cum.22 sem.	104,0	102,6	*
23 à 29 sem.	16,6	17,8	NS
Cum.29 sem.	120,6	120,4	NS

Les nombres d'œufs pondus sont différents d'un essai à l'autre en raison du type génétique mais les profils de ponte sont comparables.
Le remplacement des mâles à 15 ou 17 semaines semble perturber un peu la ponte et cet écart persiste jusqu'à 30 semaines dans le 1er essai mais il est annulé entre 22 et 29 semaines dans le second essai.

TABLEAU 3 : Fertilité : Essai N°1

Période	Taux de fertilité		
	Témoin	Renouvel.	Significat. statistique
1 à 16 sem.	93,5	93,2	NS
17 à 22 sem.	87,0	92,6	*
Cum.22 sem.	91,7	93,1	NS
23 à 31 sem.	46,0	92,6	**
Cum.31 sem.	82,6	93,0	**

TABLEAU 4 : Fertilité : Essai N°2

Période	Taux de fertilité		
	Témoin	Renouvel.	Significat. statistique
1 à 14 sem.	92,1	92,1	NS
15 à 22 sem.	90,6	92,7	NS
Cum.22 sem.	91,6	92,3	NS
23 à 29 sem.	67,4	92,4	**
Cum.29 sem.	88,3	92,3	**

La fertilité n'a pas évolué de la même manière pour les 2 lots témoin : elle a "décroché" plus tôt dans l'essai N° 1 puis elle est descendue plus bas (26 % contre 45 %) et elle est remontée plus tardivement. Dans les 2 essais elle dépasse les 80 % en fin de ponte.
La fertilité a été inférieure à 80 % pendant 10 semaines dans l'essai N° 1 et seulement pendant 4 semaines pour l'essai N° 2 sans que l'on puisse avoir une explication claire sur les raisons de cet écart.

Le renouvellement des mâles améliore nettement la fertilité dans les 2 essais et permet de la maintenir autour de 92-93 % pendant 31 semaines pour l'essai N° 1 et pendant 29 semaines pour l'essai N° 2.
L'âge des nouveaux mâles (26 et 29 semaines) et l'âge des canes (45 et 47 semaines) ne modifient pas les résultats.
Toutefois ces essais ne permettent pas de déterminer précisément les causes du maintien de la fertilité : fréquence des accouplements ? quantité et qualité de la semence ?
L'insémination artificielle en fin de ponte avec des animaux au sol ne permet pas encore d'atteindre ce niveau de fertilité (résultats non publiés) et n'est pas économiquement justifiée.

L'obstacle majeur au développement de la technique de renouvellement est naturellement d'ordre économique car le gain de productivité lié au renouvellement des mâles ne permet pas d'amortir ces mâles. Dans ce cas c'est le taux de ponte qui devient le facteur limitant.
Des essais de renouvellement partiel sont en cours en s'inspirant du rechargement en coq pour l'espèce gallus.
Une autre solution consiste à essayer de prolonger la fertilité des reproducteurs d'origine et c'est pourquoi nous avons décidé de mettre en place un programme de sélection destiné à allonger la 1ère ponte.

2.2. Sélection

Les résultats présentés concernent la lignée femelle la plus utilisée dans les croisements barbarie à rôtir commercialisés par GRIMAUD FRÈRES SÉLECTION.

TABLEAU 5 : Performances de ponte par génération

Générations	G0	G1	G2	G3 (résult. partiels)
Nb œufs/femelle présente :				
Cumul à 22 sem.	121,7	123,5	124,6	125,5
De 23 à 30 sem.	37,3	35,2	36,7	38,6
Cumul à 30 sem.	159,0	158,7	161,3	164,1
Taux de ponte :				
A 22 semaines	71,7 %	72,6 %	74,3 %	76,1 %
A 30 semaines	58,2 %	59,2 %	58,3 %	64,6 %

Les progrès sur la persistance de ponte après 22 semaines ne sont pas très spectaculaires pour l'instant mais si la 3ème génération confirme la tendance actuelle on peut espérer un progrès homogène sur les différentes phases de ponte.

Cette évolution équilibrée s'explique en partie par la bonne corrélation entre la ponte cumulée à 22 semaines et la ponte de 23 à 30 semaines. La corrélation génétique est estimée entre + 0,7 et + 0,8 selon les générations.

Les taux de ponte à 22 et 30 semaines s'améliorent progressivement et atteignent un niveau qui justifie l'allongement de la 1ère ponte.

L'héritabilité du nombre d'œufs pondus pendant les différentes phases de la ponte est estimée entre 0,2 et 0,4 selon les caractères et les générations. Elle permet d'envisager des progrès génétiques intéressants mais il faut aussi composer avec des corrélations négatives entre ponte et croissance (de 0 à - 0,3).

TABLEAU 6 : Fertilité, mortalité embryonnaire précoce et éclosabilité par génération

Générations	G0	G1	G2	G3 (résult. partiels)
Taux de fertilité :				
Cumul à 22 sem.	87,6	85,6	88,0	86,4
De 23 à 30 sem.	84,0	83,7	87,1	84,4
Cumul à 30 sem.	86,7	85,2	87,8	85,9
Taux mortalité embryonnaire précoce :				
Cumul à 22 sem.	2,23	2,16	2,56	2,24
De 23 à 30 sem.	3,04	4,27	2,34	2,84
Cumul à 30 sem.	2,42	2,63	2,51	2,38
Taux d'éclosion :				
Sur œufs mis en éclosoir	91,4	91,1	90,6	91,5
Sur œufs incubés	77,1	75,2	77,1	76,8

Ces résultats sont obtenus par insémination artificielle et incluent les tests de fertilité ce qui ne permet pas de juger précisément l'évolution des résultats. Toutefois, on peut constater que l'insémination artificielle permet de maintenir la fertilité à un niveau correct jusqu'à 30 semaines. Les résultats de 23 à 30 semaines ne sont pas très inférieurs à ceux des 22 premières semaines.
La sélection sur le nombre d'œufs pondus ne semble pas, pour l'instant, dégrader la fertilité et l'éclosabilité ; les corrélations génétiques entre ces caractères et les critères de ponte varient de + 0,3 à + 0,5.
L'héritabilité du critère "éclos sur œufs incubés" est estimé entre 0,15 et 0,25.

TABLEAU 7 : Poids des œufs et poids vif

Générations	G0	G1	G2	G3 (résult. partiels)
Poids des œufs (g)	75,9	77,4	75,8	79,9
Poids vif des fem. à 70 j. (g)	2 484	2 533	2 367	2 530

Le poids des œufs est enregistré sur un échantillon pendant le 1er mois de ponte et l'âge moyen varie légèrement d'une génération à l'autre.
Il est corrélé négativement avec le nombre d'œufs pondus (- 0,2 à - 0,3) et positivement avec les caractères de croissance (+ 0,1 à + 0,3). Le niveau actuel est satisfaisant et l'objectif est de stabiliser le poids d'œuf et le poids vif.

Conclusion

La modification du cycle de reproduction de la cane barbarie ne pourra se faire que sous certaines conditions :

1) Poursuivre le travail d'amélioration génétique en mettant l'accent sur la fertilité en fin de ponte.
2) Trouver le bon compromis économique entre la fécondation naturelle avec renouvellement des mâles et l'utilisation de l'insémination artificielle afin de concrétiser sur le terrain cette évolution du cycle de reproduction.

Sans aller jusqu'à 30 semaines, dans de nombreux cas la 1ère ponte de la cane barbarie peut être prolongée jusqu'à 25 semaines avec une fertilité satisfaisante. Cela pourrait, de plus, faciliter la mise en mue qui est plus difficile quand le taux de ponte est élevé.

Références bibliographiques

Sauveur et al., 1990, In : Le canard de barbarie – Du labo au terrain – INRA – p.122-126.